



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



Caracterização do Perfil Inflamatório em Pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e sua Relação com a Gravidade e Reversibilidade do Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo (VEF_1)

Cleriston Farias Queiroz

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



Caracterização do Perfil Inflamatório em Pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e sua Relação com a Gravidade e Reversibilidade do Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo (VEF_1)

Cleriston Farias Queiroz

Professor Orientador: Edgar Marcelino de Carvalho Filho

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia), 2015

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Bibliotecária Solange Della-Cella,
Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos/SIBI-
UFBA.**

Q 3	Queiroz, Cleriston Farias
	Caracterização do Perfil Inflamatório em Pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e sua Relação com a Gravidade e Reversibilidade do Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo (VEF1) / Cleriston Farias Queiroz. - Salvador, 2015.
	132 f.
	Orientador: Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho
	Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina, 2015.
	1. Pulmões. 2. DPOC-Inflamação. 3. Citocinas. I. Carvalho Filho, Edgar Marcelino de. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. III. Título.
	CDU: 616.2

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- 1. Régis de Albuquerque Campos (presidente)** - Professor adjunto da Universidade Federal da Bahia. Professor Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFBA; Pesquisador do Serviço de Imunologia; Pós-Doutor pela Universidade de Yale, EUA. Tem experiência na área de Medicina, com ênfase em Alergologia e Imunologia Clínica, atuando principalmente nos seguintes temas: asma, Angioedema Hereditário, Imunodeficiências primárias, Urticária e Células T NK.
- 2. Aquiles Assunção Camelier**- Professor Adjunto do Curso de Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública-Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (Módulo Clínica Integrada e Internato) e Professor Auxiliar I do Curso de Medicina da Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Pós Doutoral no Hospital Clinic de Barcelona / Universitat de Barcelona, Espanha (2007) com bolsa da Sociedad Española de Neumologia y Cirurgia Torácica (SEPAR).
- 3. Ana Luísa Godoy Fernandes**- Professora Associada Livre-docente de Pneumologia da Universidade Federal de São Paulo. Chefe da Disciplina de Pneumologia da Unifesp (2008-2009). Diretora de Educação e Exercício Profissional da SBPT (2009-2010). Pós- doutorado na University of Toronto - Canadá (1992).

Membros Suplentes:

- 1. Edgar Marcelino de Carvalho Filho** - Atualmente é Professor Titular de Clínica Médica da Universidade Federal da Bahia, Professor Titular de Imunologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos. É também Professor Adjunto da Cornell University Medical College e Professor Adjunto da University of Iowa. É editor associado do Plos Neglected Tropical Diseases, Case Reports in Medicine, da Revista Brasileira de Medicina Tropical e é membro do corpo editorial do Journal of Infectious Diseases.

“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”

(Albert Einstein)

Equipe

Nome	Função no projeto
Edgar Marcelino C. Filho	Orientador do projeto e responsável pela análise e revisão dos dados a serem publicados.
Cleriston F. Queiroz	Mestrando e responsável pelo desenvolvimento do estudo.
Antônio Carlos M. Lemos.	Coorientador do projeto e revisão dos dados.
Maria de Lourdes S. Bastos	Médica pneumologista do estudo e responsável pela avaliação clínica dos indivíduos
Margarida Célia L.C Neves	Médica pneumologista do estudo e responsável pela avaliação clínica dos indivíduos
Natália Carvalho	Bióloga, responsável pelas dosagens das citocinas.
Fabiola Jesus Ramos	Fisioterapeuta do estudo e apoio no banco de dados

Instituições Participantes

UFBA- Universidade Federal da Bahia

Fonte de Financiamento

1. Bolsa de Estudos da FAPESB (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia)
2. Serviço de Imunologia (SIM) do Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador e professor **Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho**, pelo apoio recebido durante todo este processo de crescimento acadêmico. A sua contribuição a minha formação eu levarei por toda vida.

Ao professor **Dr. Antônio Carlos Moreira Lemos**, pelo apoio não só dado a este trabalho acadêmico como por todos estes anos de trabalho em conjunto. Agradeço profundamente pela amizade, generosidade e confiança dada a mim.

A **Dr.^a Maria de Lourdes Santana Bastos** por toda confiança, amizade e apoio durante os anos de trabalho. A **Dr.^a Margarida Célia Lima Costa Neves** pela amizade, generosidade, alegria e apoio moral dado a mim por todos os anos de trabalho juntos. Vocês duas foram pessoas imprescindíveis para realização deste sonho.

Aos meus pais **Juracy Souza Queiroz e Nildes Maria Farias Queiroz**, pelo carinho, apoio, dedicação, confiança e amor. Aprendi a ser quem sou me inspirando em você dois. Aos meus irmãos e primos pela torcida e confiança. A minha tia **Marilúcia Lima de Farias** pelo carinho, respeito e dedicação dado a minha pessoa durante toda a minha vida.

Ao apoio da farmácia do Serviço de Pneumologia, ao farmacêutico **Charleston Ribeiro** e as farmacêuticas **Rejane Mafra** e **Sabrina Ribeiro**.

Ao Serviço de Imunologia pela acolhida e em especial a **Dr.^a Natália Carvalho** pela dedicação as análises do estudo e ao secretário **Cristiano Franco**.

Aos meus amigos do Serviço de Pneumologia, **Maria Gorethe**, enfermeira **Nereide Pimentel**, **Antônia Alves**, **Leticia Matos**, **Fisioterapeuta Fabiola Jesus**, as **Assistentes Sociais Renata Fontoura** e **Ivonilda S. Reis**. Aos médicos **Dr. Gilvandro A. Rosa**, **Dr.^a Fernanda Pires**, **Dr.^a Tatiana Galvão**, **Dr.^a Marta Leite**. As técnicas de enfermagem **Claudia Lemos**, **Lêda Sergio** e **Graça Paula Guimarães**.

Ao meu senhor **Deus** e toda **Espiritualidade** pela perseverança, proteção e ajuda em toda minha trajetória de vida.

Sumário

Índice de figuras, gráficos e tabelas	13
Abreviaturas e siglas	15
I. Resumo	17
II. Objetivos	19
II.1 Objetivo Geral	19
II.2 Objetivos secundários	19
III. Introdução	20
IV. Revisão da literatura	28
IV. 1. Aspectos inflamatórios, imunológicos e sistêmicos da DPOC	28
IV. 2. Síndrome de Sobreposição (<i>overlap</i>)	31
IV. 3. Teorias sobre a DPOC	34
IV. 4. Exames, monitoramento e classificação da gravidade da DPOC	36
V. Casuística, Material e Métodos	42
V.1. População do estudo	42
V.2. Aprovação do comitê de ética em pesquisa	43
V.3. Delineamento e local do estudo	43
V.4. Critérios de inclusão	43
V.5. Critérios de exclusão	44
V.6. Definições de casos	44
V.7. Variáveis estudadas	45
V.8. Análise estatística	46
V.9. Exames, equipamentos e protocolos.	46
VI. Resultados	51
VI. 1. Características da amostra	51
VI. 2. Comparação da celularidade no escarro, estágios de gravidade	52

	11
e avaliação da atopia.	
VI. 3. Avaliação entre os estágios de gravidade e os valores de neutrófilos e eosinófilos no escarro.	54
VI. 4. Relação entre os estágios e os parâmetros de gravidade da DPOC.	55
VI. 5. Relação do numero de internações, visitas a emergência e uso de medicamentos no último ano versus os estágios da DPOC.	56
VI. 6. Comparação dos níveis das citocinas séricas TNF e IL-6 entre os grupos 1, 2 e grupo controle.	58
VI. 7. Comparação dos níveis séricos das quimiocinas IL-8 e RANTES/CCL-5 entre os grupos 1, grupo 2 e grupo controle.	59
VI. 8. Correlação entre a porcentagem de eosinófilos no escarro e o parâmetro de gravidade VEF1.	60
VI. 9. Correlações entre os níveis das citocinas séricas IL-6, TNF e as quimiocinas IL-8 e CCL-5 com os estágios de gravidade da DPOC.	61
VI. 10. Relação do nível sérico do TNF com Índice de Massa Corpórea (IMC) entre os grupos 1, grupo 2 e o total de pacientes.	64
VII. Discussão	66
VIII. Conclusão	72
IX. Limitações do estudo	73
X. Perspectivas futuras	74
XI. Sumary	75
XII. Referências bibliográficas	78
XIII. Anexos	89
XIII.1. Artigo	90
XIII.2. Normas de publicação da revista	116
XIII.3. Termo de consentimento livre e esclarecido	122
XIII.4. Ficha de avaliação clínica dos pacientes.	124

XIII.5. Ficha de avaliação celular do escarro induzido.	128
XIII. 6. Ficha de avaliação do <i>PRICK-TEST</i> .	129
XIII.7. Parecer do comitê de ética em pesquisa CEP\C-HUPES	130

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS.

Figuras

Figura 1- Fisiopatologia das manifestações sistêmicas e locais na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). **24**

Figura 2- Classificação de gravidade da DPOC (GOLD, 2010). **38**

Gráficos

Gráfico1(a, b) - Níveis séricos das citocinas (pg/ml) TNF- α e a IL-6 em pacientes portadores de DPOC no grupo 1, grupo 2 e indivíduos saudáveis como grupo controle(HC). **58**

Gráfico 2 (a, b) -Níveis séricos das quimiocinas (pg/ml) IL-8 e a CCL-5 em pacientes portadores de DPOC no grupo 1, grupo 2 e indivíduos saudáveis como grupo controle (HC) . **59**

Gráfico 3 (a, b)- Porcentagem de eosinófilos no escarro e os valores do VEF1 pré e pós broncodilatador dos pacientes com DPOC , incluindo o grupo 1 e grupo 2 numa avaliação total. **61**

Gráfico 4 (a, b, c ,d)- Relação entre os níveis séricos das interleucinas IL- 6, TNF e as quimiocinas IL-8 e CCL-5 com os estágios de gravidade da DPOC. **63**

Gráfico 5 (a, b , c)- Relação entre o nível sérico de TNF e os valores do IMC nos **65**

nos grupo 1, grupo 2 e total de pacientes com DPOC.

Tabelas

Tabela 1- Dados demográficos e clínicos dos pacientes com DPOC.	52
Tabela 2- Valores da contagem celular no escarro induzido (EI), estágios de gravidade e resultados do teste alérgico dos pacientes com DPOC.	54
Tabela 3- Contagem de neutrófilos e eosinófilos no escarro versus estágios da DPOC.	55
Tabela 4- Dados da função pulmonar (espirometria) versus estágios da DPOC na amostra total.	56
Tabela 5- Dados do uso de medicação, hospitalização e visitas à emergência no último ano.	57

Abreviaturas e Siglas

ACOS: *Asthma, Copd and Asthma-Copd Overlap Syndrome*

BD: Broncodilatação

BR: Bronquíolos respiratórios

CCL-5: Quimiocina CCL-5

CD4+: Linfócito T auxiliar CD4+

CD8+ : Linfócito T auxiliar citotóxico CD8+

Células B: Linfócito B

Células T: Linfócitos T

CI: Corticoide Inalatório

CVF: Capacidade Vital Forçada

C-HUPES: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ECP: Lipocalina neutrofílica humana

EI: Escarro induzido

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EPO: Peroxidase do eosinófilo

GINA: *Global Initiative for Asthma*

GM-CSF: *Granuocyte macrophage colony stimulating factor*

GOLD: *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*

IL-6: Interleucina - 6

IL-8: Inteleucina - 8

IL-1 β : Interleucina 1beta

IMC: Índice de massa corpórea

LBA: Lavado broncoalveolar

LTB4: Leucotrieno B4

MMP9: Matrix metalloproteinase - 9

N-acetil L- cisteína: Cisteína

NO: Oxido nítrico

O₂: Oxigênio

OMS: Organização Mundial de Saúde

PC₂₀: Concentração padrão da queda de 20% do VEF₁ na broncoprovocação

PCR: Proteína C- Reativa

PLATINO: Projeto latino-americano de investigação em obstrução pulmonar

RANTES: *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*

ROS: *Reactive oxygen species*

SBPT: Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia

SpO₂: Saturação periférica de oxigênio

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th2: Linfócitos T *helper* 2

TNF α : *Tumor necrosis factor α*

UFBA: Universidade Federal da Bahia

VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo

VEF₁/CVF: Relação entre o volume expiratório forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada

I. Resumo

Caracterização do Perfil Inflamatório em Pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e sua Relação com a Gravidade e Reversibilidade do Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo (VEF_1)

Objetivo: Determinar a relação entre a frequência de eosinófilos e os níveis de citocinas séricas com estágios da DPOC com base na reversibilidade do FEV1 e uma correlação entre esses biomarcadores e gravidade da DPOC.

Métodos: Estudo de corte transversal realizado em 37 pacientes, portadores de DPOC (de acordo com a *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* GOLD, 2010). Os pacientes responderam a um questionário clínico, realizaram exames físicos e foram submetidos à prova de função pulmonar (espirometria), com ênfase nos parâmetros funcionais do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), capacidade vital forçada (CVF) e da relação (VEF_1 / CVF) $<70\%$ de acordo com GOLD, 2010. A análise da celularidade do escarro induzido (EI) foi realizada após citocentrifugação do material e o *PRICK -TEST* para alérgenos foi realizado em todos os pacientes. Os níveis de citocinas foram determinados por método de ELISA.

Resultados: Os pacientes foram classificados em dois grupos com base no VEF_1 após broncodilatador. Em 24 pacientes (grupo 1) não havia resposta significativa após broncodilatador e 13 pacientes tiveram uma resposta com uma média $\geq 12\%$ de reversibilidade e foram classificadas como grupo 2. Os parâmetros de gravidade avaliados pelos resultados dos testes de função pulmonar foram os seguintes: todos os pacientes na amostra estavam com a relação (VEF_1 / CVF) $\leq 70\%$ do previsto de acordo com as diretrizes do GOLD, 2010 (Tabela 1). O VEF_1 pré / pós broncodilatador no grupo 1 teve

mediana de 48 (30-66) \ 51 (35-71), enquanto que no grupo 2 foi de 35 (28-44) \ 47 (36-52) ($p < 0.03$). Os estágios da gravidade da DPOC tiveram os seguintes resultados: O número de pacientes no grupo 1 na fase II, III e IV foram 6 (27,3%), 12 (50%) e 6 (27,3%), respectivamente, no grupo 2 zero, 12 (92,3%) e 1 (7,7%). Os níveis séricos do TNF e IL-6 foram maiores em pacientes com DPOC do que nos controles ($p < 0.001$). A IL-6 foi maior nos pacientes do grupo 1 do que os controles ($p < 0.001$). Houve uma correlação inversa entre os níveis de TNF e IMC em ambos os grupos. **Conclusões:** 1- Os neutrófilos foram o tipo de célula predominante em ambos os grupos de pacientes com DPOC independentes da reversibilidade do VEF₁%. 2. História anterior de atopia, a positividade do teste alérgico e CCL5 não estão associados a pacientes com DPOC que tinham reversibilidade do VEF₁. 3. Os pacientes que tiveram reversibilidade do VEF₁ não têm DPOC mais grave. 4. Houve uma associação com os níveis séricos de TNF com níveis mais baixos de IMC.

Palavras - chaves – DPOC, Inflamação, eosinófilos, neutrófilos, citocinas, análise transversal.

II. Objetivos

II. 1. Objetivo Geral

Determinar a relação entre a frequência de eosinófilos e os níveis de citocinas séricas com estágios da DPOC com base na reversibilidade do VEF₁ e uma correlação entre esses biomarcadores e gravidade da DPOC.

II . 2. Objetivos secundários

II. 2.1. Correlacionar o infiltrado inflamatório (quantitativamente) com a gravidade da doença.

II. 2.2. Avaliar a associação entre a presença de eosinófilos no escarro com atopia.

II. 2.3. Associar citocinas pró – inflamatórias do soro IL 6, TNF, e quimiocinas IL-8 e RANTES/CCL-5 com a reversibilidade do VEF₁ e gravidade da DPOC.

III. Introdução

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença inflamatória das vias respiratórias, do parênquima e dos vasos pulmonares, evoluindo com lenta, progressiva e irreversível obstrução ao fluxo expiratório. A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que, nos próximos anos, ela se tornará a 5ª doença em prevalência no mundo e a 3ª causa de mortalidade¹. É uma epidemia mundial afetando cerca de 600 milhões de pessoas em todo mundo, causando 2,2 milhões de mortes a cada ano e apresentando uma alta morbidade e grande impacto econômico e social². Nos últimos dez anos, a DPOC foi a quinta maior causa de internação no Sistema Único de Saúde (SUS) em maiores de 40 anos, com cerca de 200.000 hospitalizações e gasto anual aproximado de 72 milhões de reais³.

O estudo PLATINO (projeto latino-americano de investigação em obstrução pulmonar), que avaliou a prevalência de DPOC em cinco cidades da América Latina, encontrou 18% de prevalências em homens e 14% em mulheres na cidade de São Paulo⁴. A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada por sinais e sintomas respiratórios associados à obstrução crônica das vias aéreas inferiores, geralmente em decorrência de

exposição inalatória prolongada a material particulado ou gases irritantes ⁵.

A resposta inflamatória das vias aéreas tem recebido especial atenção nos últimos anos, com mecanismos descritos, mas ainda com questionamentos sobre a patogênese desta resposta ⁶. Uma variedade de células e mediadores inflamatórios está envolvida, mas o papel de cada um deles no mecanismo da resposta inflamatória na DPOC ainda não está claramente estabelecido. A patogênese da DPOC engloba uma série de processos lesivos, que incluem a resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas inaladas e gases. Outros processos, tais como a resolução deficiente da inflamação, a falha na reparação de células anormais, a apoptose precoce, a destruição da matriz extracelular pelo desequilíbrio protease/antiprotease e oxidante/antioxidante são mecanismos patogênicos envolvidos na doença⁷. O melhor entendimento do processo inflamatório levará a um melhor conhecimento no manejo da DPOC ².

A exposição ao tabaco é a principal etiologia da doença, mas outros poluentes ambientais como partículas e gases também são importantes ⁸. O tabaco e os gases tóxicos promovem uma resposta inflamatória que envolve muitos tipos de células e mediadores inflamatórios. Em algumas circunstâncias, os linfócitos e os monócitos migram em grande quantidade para o pulmão ⁹. Lá, eles são ativados e geram uma reação inflamatória que, ao longo dos anos, acarreta alterações na estrutura e função pulmonares.

Este processo inflamatório acontece nas pequenas vias respiratórias (menores que 2 mm), sendo normalmente tênue e ininterrupto¹⁰. Postula-se que a responsável pela ruptura das estruturas epiteliais de sustentação alveolar seja a inflamação persistente das vias respiratórias distais em pacientes com DPOC. Assim, os alvéolos e ductos alveolares coalescem de forma irregular e definitiva¹¹.

Estudos já demonstraram que nas exacerbações da DPOC havia um incremento muito significativo de neutrófilos e eosinófilos. A DPOC não é uma doença somente pulmonar, mas sistêmica, que apresenta como ponto importante este componente inflamatório¹². O processo inflamatório na DPOC é complexo e envolve diferentes células, mas caracteristicamente o processo inflamatório é neutrofílico¹³. Porém, na DPOC inclusive na fase estável é possível encontrar eosinófilos em cerca de 40% dos pacientes. Pensava-se, inicialmente, que havia eosinófilos somente num subgrupo de DPOC, com comportamento clínico similar à asma ou síndrome da *overlap* (sobreposição), mas a presença de eosinófilos tem sido enfatizada não somente na agunização como na fase de estabilidade da doença¹⁴. Mesmo após a cessação ao tabagismo, mastócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos CD4+ e CD8+, células dendríticas e eosinófilos continuam aumentadas nas via aérea, alvéolos, músculo liso e vasos dos pulmões e podem contribuir para progressão da doença^{15, 16}. A inflamação contribui para a alteração do

balanço entre produção e degradação de proteínas da matriz extracelular levando à destruição da parede alveolar. Os macrófagos pulmonares nos pacientes com DPOC tem maior atividade bioquímica, participando juntamente com os neutrófilos da inflamação¹⁷.

Os pacientes com DPOC também apresentam aumento dos níveis de outros marcadores inflamatórios incluindo a proteína C-reativa (PCR), interleucina - 8 (IL-8), interleucina - 6 (IL-6), TNF-alfa, a quimiocina RANTES dentre outras¹⁸. Além disso, os neutrófilos, IL-8 e a proteína catiônica eosinofílica estão mais elevados em tabagistas com DPOC¹⁹. Até os 25 anos de idade é possível distinguir entre os pulmões de fumantes e de não fumantes, com base no acúmulo anormal de macrófagos pigmentados nos bronquíolos respiratórios (BR), muitas vezes acompanhado de edema, hiperplasia epitelial e fibrose nas paredes broncoalveolares e alveolares adjacentes²⁰. É possível, segundo Laperre *et al*²¹, que a inflamação relacionada ao tabagismo tenha duas etapas: uma inicial, no epitélio e na submucosa com participação de neutrófilos e macrófagos e uma tardia, com participação adicional de linfócitos e eosinófilos.

A inflamação pulmonar, quando estabelecida no pulmão parece não depender, mais do tabagismo e se correlaciona com a inflamação sistêmica, contribuindo para o desenvolvimento de comorbidades como doenças

cardiovasculares, caquexia, fraqueza dos músculos esqueléticos, anemia, diabetes, distúrbios do sono, osteoporose, depressão e câncer de pulmão ².

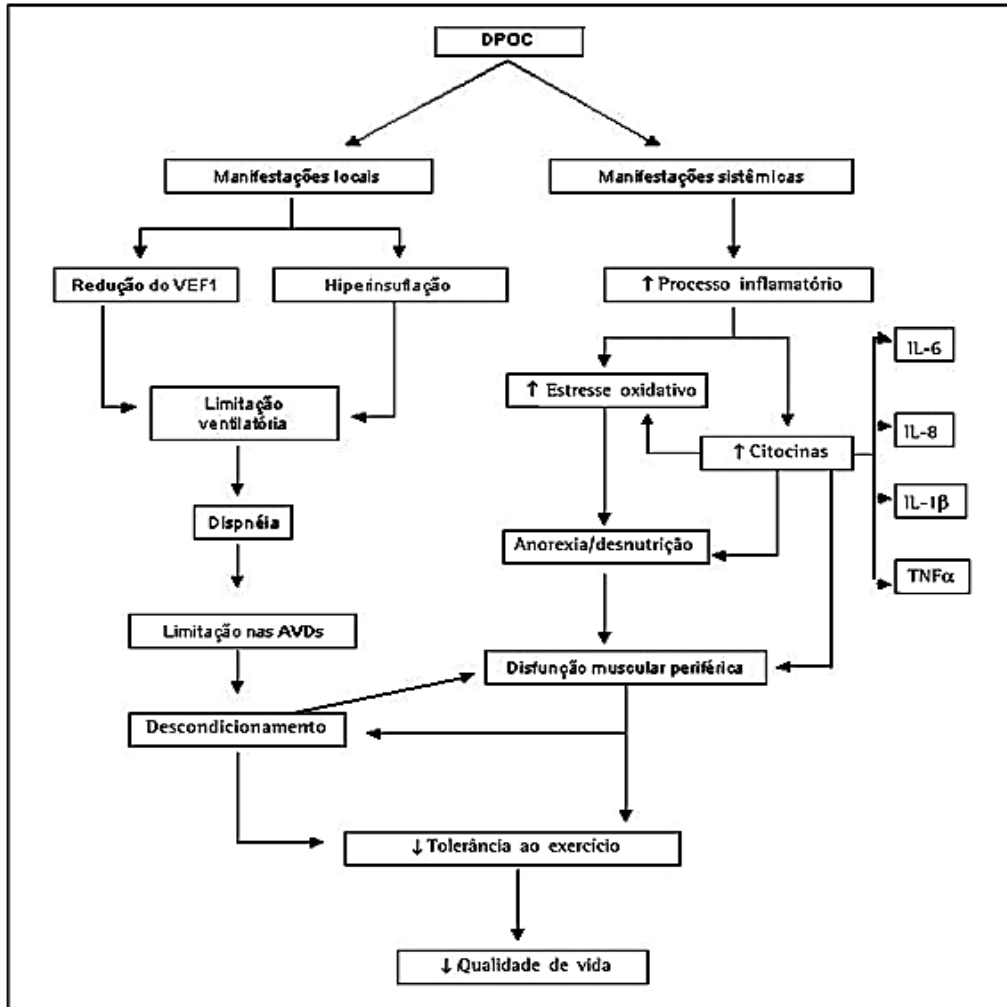


Figura 1 - Fisiopatologia das manifestações sistêmicas e locais da doença pulmonar obstrutiva crônica

Figure 1- Fisiopatologia e manifestações sistêmicas na DPOC.²²

A inflamação local neutrofílica é a característica principal da DPOC juntamente com o aumento de mediadores inflamatórios tanto nas vias aéreas como no sangue circulante e tem sido bem caracterizada na fisiopatogênica da doença ²³. A primeira e mais consistente anormalidade encontrada nas vias aéreas de pacientes com DPOC é a infiltração celular da parede e luz

brônquicas ²⁴. Estudos em animais demonstraram que a exposição à fumaça de cigarro promove a proliferação de neutrófilos nas vias aéreas ²⁵. Dessa forma, não é surpreendente que vários autores tenham publicado estudos relatando o aumento de neutrófilos no escarro e no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com DPOC.²⁶

Os neutrófilos estão implicados na liberação de citocinas inflamatórias, mediadores lipídicos e enzimas capazes de promover dano tecidual. Além disso, podem promover hipersecreção de muco por meio de efeito secretagogo e pela proliferação de glândulas mucosas. A destruição pulmonar estaria relacionada ao desequilíbrio entre proteases e antiproteases²⁷.

O neutrófilo foi tido como fator importante para o desencadeamento da doença, já que esse desequilíbrio seria mantido através da liberação de enzimas neutrofílicas, o que ocasionaria o aumento de proteases no pulmão²⁸.

Outra célula inflamatória presente no escarro e sangue periférico de pacientes com DPOC, requer atenção. O papel dos eosinófilos na DPOC é incerto. Alguns autores relataram o aumento destas células no escarro e no LBA dos pacientes com DPOC. ²⁹ Enquanto que, outros associaram esse aumento a uma melhor resposta ao uso de corticosteroides, à associação com doença asmática ou à ocorrência de exacerbação da doença¹⁴. É interessante o fato de que os níveis das proteínas eosinofílicas estão tão aumentados na DPOC quanto na asma, mesmo quando a contagem de eosinófilos é menor

nos pacientes com doença brônquica irreversível, sugerindo que as células tenham degranulado e não possam ser vistas ao microscópio. É possível que esta degranulação acentuada ocorra devido à atuação da elastase neutrofílica, que costuma estar elevada nos pacientes com DPOC e que causa degranulação de eosinófilos³⁰.

Todo processo inflamatório é realizado com a participação de células e de seus mediadores. Entre estes, é importante ressaltar a participação das citocinas no processo inflamatório pulmonar, especificamente na DPOC³¹. Assim, o padrão de citocinas liberado na DPOC é diferente do observado em pacientes asmáticos ou em outras doenças inflamatórias. Como várias citocinas são liberadas ao mesmo tempo, o efeito sinérgico ou antagônico de uma citocina sobre outra resultará no padrão inflamatório de uma determinada patologia³¹.

A severidade da obstrução do fluxo de ar pode ser determinada pela magnitude da diminuição do VEF₁ e as fases de DPOC baseiam-se em pós-broncodilatador nível VEF₁³². Uma vez que o diagnóstico de DPOC é feito, teste da função pulmonar é útil para monitorizar quantitativamente o curso da doença. Para determinar a gravidade da DPOC, VEF₁ e uma avaliação de reversibilidade é reconciliado com a *Global Initiative for Chronic Lung Disease* (GOLD)³³.

A DPOC hoje pode ser considerada uma epidemia, mas o conhecimento da inflamação e de seus componentes ainda está na fase inicial e os métodos atuais de diagnóstico continuam sendo os mesmos do passado ⁷. A ameaça de aumento e progressão da doença ainda permanece. A DPOC representa um grande desafio para pesquisadores, médicos e gestores de saúde.

IV. Revisão da Literatura

IV. 1. Aspectos Inflamatórios, imunológicos e sistêmicos da DPOC.

A inflamação crônica na DPOC está associada ao aumento da produção de vários mediadores e proteínas pró-inflamatórias, incluindo citocinas, quimiocinas, enzimas inflamatórias, receptores e moléculas de adesão, que são reguladas por fatores de transcrição genética.^{34, 35} Dentre os mediadores, destacam-se aqueles que exercem atividade quimiotática para células inflamatórias, notadamente o leucotrieno B₄ e IL-8, assim como as citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6³⁵. Também são considerados importantes os fatores de crescimento, incluindo TGF- β , que induz fibrose nas pequenas vias aéreas³⁵.

Os elementos celulares mais importantes na inflamação na DPOC são as células epiteliais, os neutrófilos, os macrófagos alveolares e os linfócitos CD8, assim como, durante os períodos de exacerbação, os eosinófilos³⁶.

Marcadores sistêmicos do estresse oxidativo e níveis plasmáticos elevados de mediadores inflamatórios têm sido relatados em fumantes e em portadores de DPOC³⁷. Os neutrófilos periféricos de portadores de DPOC liberam mais *reactive oxygen species* (ROS, espécies reativas de oxigênio) que os de indivíduos normais não fumantes³⁸. Produtos da peroxidação lipídica também

estão aumentados no plasma de fumantes com DPOC, particularmente durante os períodos de exacerbação³⁹. A inflamação crônica está incluída entre os fatores envolvidos no mecanismo gerador das manifestações sistêmicas, tais como a perda de peso e a disfunção da musculatura esquelética, observadas em alguns pacientes com DPOC. Os portadores de DPOC também apresentam um risco aumentado para doenças cardiovasculares³⁹. Um dos mecanismos prováveis para esse aumento é o dano endotelial causado pela inflamação e pelo estresse oxidativo sistêmicos presentes nestes pacientes³⁹.

Indivíduos com DPOC tem inflamação pulmonar periférica, que pode “transbordar” para circulação sistêmica, levando à fraqueza muscular esquelética e caquexia, doenças cardiovasculares, metabólicas e ósseas, além de depressão³⁹. Há um aumento de citocinas circulantes, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , bem como proteínas de fase aguda, tais como PCR e amilóide sérica¹⁸. A inflamação pulmonar periférica pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão⁴⁰.

A DPOC, além de afetar a estrutura e a função pulmonar, também acarreta efeitos extrapulmonares significativos. Os chamados efeitos sistêmicos da DPOC que são: as anormalidades nutricionais e a disfunção muscular periférica. (Casanova, 2005)⁴¹. Portanto, o quadro clínico e as repercussões no estado geral de saúde do paciente sofrem a influência das manifestações sistêmicas da DPOC, reforçando a necessidade da abordagem

multidimensional que contemple todos os componentes da doença. Além disso, existe a consideração de que a inflamação sistêmica na DPOC possa estar diretamente associada com a mortalidade e a deterioração causada pela doença ⁴¹.

Este comprometimento de outros órgãos na DPOC, além do pulmão é explicado pela teoria do “mecanismo comum” explicada pela expressão do comprometimento de múltiplos órgãos por ação dos componentes da fumaça do cigarro, produzindo uma inflamação que afetaria não só os pulmões, mas também outros órgãos periféricos ³⁹. O pulmão neste caso atuaria como uma porta de entrada. Uma variação desta teoria, é a teoria dos “órgãos integrados” em que o pulmão inflamado afetaria outros órgãos e a inflamação neste outros órgãos, voltaria para o pulmão através da circulação sistêmica, produzindo a piora da DPOC ³⁹.

Na teoria definida como teoria da “susceptibilidade comum genética e ambiental”, após estímulos como o tabaco, haveria uma amplificação da resposta fisiológica e um desequilíbrio no mecanismo da doença e reparação, com auto perpetuação da inflamação. ^{42, 43}. Existe também uma resposta imune anômala, associada com susceptibilidade genética mesmo após o abandono do tabagismo ⁴⁴. A resposta adaptativa imunológica é essencial para o processo patológico sistêmico da DPOC, o tabagismo e a colonização bacteriana crônica seriam fonte de antígenos, levando a proliferação de cé-

lulas B e T, conseqüentemente, produção de anticorpos mantendo o mecanismo autoimune ⁴⁵.

IV. 2. Síndrome de sobreposição (*overlap*)

Foi demonstrado por Mannino et al (2008)⁴⁶ que existe aumento do risco de mortalidade quando há associação de outras doenças com a DPOC .

A síndrome de sobreposição (*overlap*) tem sido crescentemente reconhecida, embora as suas características clínicas ainda não estejam bem definidas. Classicamente, é reconhecido que a asma brônquica não controlada é um fator de risco para a DPOC, mas esses pacientes são excluídos de ensaios clínicos ⁴⁷. Estudos recentes, que incluíram pacientes com DPOC e antecedentes de asma ou que se dedicaram especificamente a essa população, vieram demonstrar que os pacientes com essa sobreposição têm geralmente idade inferior àquela de pacientes com DPOC apenas, assim como menor história de exposição ao tabaco, exacerbações mais frequentes e maior perda de qualidade de vida ⁴⁸. Os pacientes com essa sobreposição foram responsáveis por gastos em cuidados de saúde cinco vezes superiores àqueles com apenas um dos diagnósticos em um estudo⁴⁸. Assim, a identificação desse subgrupo de pacientes torna-se importante, uma vez que,

provavelmente, se justifica uma intensificação da terapêutica, com o objetivo de reduzir as exacerbações⁴⁸.

A DPOC e a asma são importantes doenças respiratórias em todo o mundo, e isso é fundamental para diferenciar entre estas duas condições a prática clínica, porque as medidas terapêuticas que deve ser adotada para cada uma devem ser distintas. As diferenças funcionais entre asma e DPOC são de valor inestimável para os estudos clínicos e a sua patologia⁴⁹.

Na prática clínica, algumas patologias, com maior frequência, mimetizam a asma. A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) nos adultos talvez seja a mais comum. Embora ambas possam coexistir (10% dos pacientes com asma têm características de DPOC), às vezes torna-se um desafio para o clínico distingui-las⁵⁰. Ambas apresentam semelhanças entre si, pois ambas são doenças crônicas, apresentam inflamação com limitação ao fluxo aéreo, causam broncoconstrição e conseqüente dispneia, acometem as pequenas vias aéreas e secretam muco. Na maioria das vezes a asma inicia-se na infância, enquanto que a DPOC é mais prevalente em adultos, ocorrendo com maior frequência na sexta e sétima décadas, e com nítida associação com o tabagismo⁵⁰. Quando o início da asma ocorre na idade adulta em pacientes fumantes, a distinção nem sempre é clara. Um fator importante é a atopia, pois a grande maioria dos asmáticos são atópicos, apresentando por vezes

outras doenças como a rinite alérgica e o eczema, devendo ser ressaltado, entretanto, que nem todo o atópico apresenta asma ⁵⁰.

A asma caracteriza-se pela hiperresponsividade brônquica que predispõe o paciente ao broncoespasmo quando exposto a agentes desencadeantes como a inalação de poeira doméstica, polens, pelos, substâncias excretadas por animais, irritantes (fumaça de cigarro, poluição ambiental, *smog*, gás natural, propano), pó de giz, odores fortes, aerossóis químicos, mudanças de temperatura e pressão do ambiente, etc. Os sintomas da asma variam de um dia para outro. A DPOC caracteriza-se pela dispneia durante o exercício ⁵⁰.

Um estudo recente demonstrou que embora a atopia seja uma característica marcante da asma, existe uma alta frequência de atopia em pacientes com DPOC, utilizando ferramentas simples e reprodutíveis para identificação tais como: caracterização de sintomas nasais, presença de eosinófilos no muco nasal e teste cutâneo de alergia ⁵¹.

As provas de função pulmonar contribuem para o diagnóstico e para distinguir uma doença da outra. Embora, ambas sejam doenças obstrutivas, as provas funcionais são normais nos asmáticos leve intermitentes e leve persistentes. A obstrução na DPOC se deve primariamente à obstrução fixa das vias aéreas e ao conseqüente aumento na resistência das mesmas e é sempre progressiva ⁵⁰.

A subutilização da espirometria tem sido relatada como um fator determinante no subdiagnóstico da DPOC. Em uma análise sobre esse tema, destacou-se a importância de uma maior divulgação do método entre os médicos clínicos e foi ressaltado que essa medida poderia ajudar tanto no subdiagnóstico como no sobrediagnóstico de DPOC ⁵². Isso também foi mostrado no estudo PLATINO, no qual apenas 20% dos pacientes com DPOC já tinham realizado uma espirometria ⁴.

O diagnóstico de DPOC é feito diante de sinais e sintomas respiratórios crônicos, na presença de fatores de risco para a doença, associados a distúrbio ventilatório irreversível de tipo obstrutivo na espirometria relação volume expiratório forçado em primeiro segundo (VEF1)/capacidade vital forçada (CVF) <70% do previsto, após teste com broncodilatador (BD), em situação clínica estável ⁵³.

Com vistas à identificação precoce, está indicada a realização de espirometria com teste BD em pacientes fumantes ou ex-fumantes, com mais de 40 anos, que apresentem sintomas respiratórios crônicos ⁵⁴. O aconselhamento antitabagismo deve ser realizado em todos os casos de tabagismo ativo, independentemente do resultado da espirometria ⁵⁵.

IV. 3. Teorias sobre DPOC.

Em 1961, a “teoria holandesa” descreve que a hiperreatividade brônquica (HRB), ou seja, a redução anormal do calibre brônquico a estímulos inalados

se correlacionava com o maior declínio do VEF₁ em fumantes⁵⁶. A partir dessa constatação, considerou-se que uma parcela de pacientes tabagistas poderia ter como gênese do desenvolvimento da DPOC a HRB⁵⁷.

A participação da HRB como um dos mecanismos de obstrução na DPOC esta sendo revista. Observações de que fumantes não asmáticos podem apresentar maior sensibilização para certos alérgenos ocupacionais, assim como valores de IgE e de eosinófilos sanguíneos maiores do que nas pessoas não tabagistas e sem antecedentes alérgicos, contribuíram para que a teoria holandesa, apesar de antiga e frequentemente questionada, se revitalizasse⁵⁸.

Outra hipótese que surgiu na mesma época da teoria holandesa foi a teoria britânica, que descrevia que o declínio da função pulmonar em DPOC era decorrente das infecções pulmonares presente no escarro dos pacientes⁵⁹.

É indiscutível que a evolução da doença guarde relação com a intensidade e a extensão do processo inflamatório. A semelhança da asma brônquica com a DPOC tem como essência uma resposta exagerada aos estímulos decorrentes dos mediadores inflamatórios. Na asma, o eosinófilo é o protagonista principal. Na DPOC, o neutrófilo é o responsável pelos eventos mais marcantes⁶⁰.

Por fim, há os indivíduos que apresentam *overlap syndrome* — superposição de asma e DPOC. Recentemente o *Global Initiative for Asthma (GINA)* e o *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)*, de-

finiu uma nova sigla para associar estas duas doenças como: *Asthma, Copd and Asthma-Copd Overlap Syndrome (ACOS)*, caracterizada por persistente limitação ao fluxo aéreo com vários aspectos associados à asma e a DPOC, que atinge cerca de 15 a 20% dos pacientes ⁶¹. Alguns são asmáticos típicos com historia familiar, eosinofilia e atopia, mas que evoluem com remodelamento, obstrução fixa das vias aéreas e difícil controle. Outros possuem características marcantes de DPOC, todavia exibem algum grau de resposta aos corticosteroides e a obstrução melhora na prova broncodilatadora ⁶². Seriam fenótipos diferentes de uma mesma doença? Não há, ainda, evidencia para tal afirmação ^{63, 64}.

IV. 4. Exames, monitoramento e classificação da gravidade da DPOC.

A DPOC se constitui, hoje e certamente por muito tempo, em uma entidade desafiadora para os estudiosos. Quem desejar conhecer melhor as nuances da enfermidade e resolver investigar seus pacientes de forma mais abrangente terá que avaliar múltiplos desfechos, pois não ha parâmetro isolado ideal. A monitorização dos marcadores inflamatórios é outra estratégia de estudo. Exames de imagem como a radiografia ou TC de tórax ou de membros inferiores, têm sido usados como desfecho em alguns estudos. A avaliação funcional e fundamental para o diagnóstico e o prognóstico em

qualquer caso. A medida do VEF_1 por espirometria, embora seja um exame simples e acessível, tem sido negligenciada na documentação dos casos.⁴

Na presença de um quadro clínico compatível, a espirometria se faz necessária para o diagnóstico da DPOC, caracterizando-se por obstrução persistente a partir do valor da relação $VEF_1/CVF\%$ após a broncodilatação < 70% do previsto². Este critério é simples independente dos valores de referencia, e é utilizado em numerosos ensaios clínicos em pacientes portadores de DPOC. A relação entre o VEF_1 e a capacidade vital lenta (CVL) também pode ser utilizada. O grau de reversibilidade, variação da medida do VEF_1 antes e depois do uso de broncodilatador, não é útil no diagnóstico. A espirometria é um teste funcional amplamente utilizado, e seus parâmetros, sobretudo o VEF_1 , apresentam boa reprodutibilidade². Uma das formas de se avaliar a gravidade da DPOC é através da função pulmonar, utilizando-se a medida do VEF_1 após a broncodilatação, estabelecendo pontos de cortes específicos para a graduação da obstrução. Esta graduação da gravidade foi classificada de acordo com VEF_1 pós resposta a broncodilatação (BD) e relação VEF/CVF <70% do previsto, nos estágios I, II, III, IV².

Vef1 pós-bd

LEVE - I	VEF/CVF < 0,70 VEF1 ≥ 80% previsto
MODERADO - II	VEF/CVF < 0,70 VEF1 ≥ 50% e < 80% previsto
GRAVE - III	VEF/CVF < 0,70 VEF1 ≥ 30% e < 50% previsto
MUITO GRAVE - IV	VEF/CVF < 0,70 VEF1 < 30% 80% previsto ou < 50% previsto + insuficiência respiratória crônica*

* PaO₂ < 60 mmHg com ou sem PaCo₂ > 50 mmHg**Figura 2- Classificação de gravidade da DPOC.²**

A análise do escarro é outra ferramenta muito útil na avaliação da inflamação e gravidade, no monitoramento, inclusive, ajuda a esclarecer a síndrome da *overlap* na DPOC. Sabendo-se que a exacerbação da DPOC é caracterizada por um aumento do processo inflamatório das vias aéreas, sendo possível investigar e monitorar os pacientes por meio da técnica do escarro induzido (EI), demonstrando ser uma técnica segura e de boa reprodutibilidade como demonstrou o trabalho publicado no *Respiratory Medicine* por Brightling *et al* em 2001⁶⁵.

No início da década de 1990 esse método passou a ser empregado na investigação da inflamação brônquica associada à asma. Pin *et al* em 1992⁶⁶ foram os primeiros a utilizar a indução do escarro em asmáticos, obtendo material adequado para estudo de células da árvore brônquica em 77% das

primeiras tentativas de coleta, aumentando esse índice para 84% após uma segunda indução. Dos 17 asmáticos estudados, apenas um apresentou queda do VEF₁ superior a 20% do valor inicial, as diferenças entre os percentuais de eosinófilos e mastócitos entre sadios e doentes foi semelhante a outros métodos de investigação e a reprodutibilidade das contagens percentuais das diversas células foi satisfatória. Em estudo posterior, os mesmos autores utilizaram o EI para estudar os efeitos da broncoprovocação específica em pacientes com asma, e observaram aumento da contagem percentual de eosinófilos e mastócitos no escarro, aumento esse relacionado significativamente à redução da PC₂₀ de histamina após a provocação, confirmando, pelo EI, os achados de outros autores que utilizaram o LBA e a biópsia brônquica com o mesmo objetivo.⁶⁷

Outros investigadores desenvolveram técnicas diferentes para a realização de contagens de células diferenciais medindo marcadores moleculares da inflamação no sobrenadante do escarro⁶⁸. Recentemente foram propostas formas mais simples e rápidas de processamento do material para contagem do percentual de eosinófilos que, se devidamente validadas, poderão aumentar a utilização do método na prática clínica⁶⁹. Em indivíduos normais o percentual de eosinófilos no EI varia de 0 a 1,4% e acima de 1,5% são indicativos da presença de inflamação eosinofílica e seu aumento se

correlaciona com parâmetros clínicos e funcionais de gravidade.⁷⁰

O EI foi inicialmente utilizado para o diagnóstico de câncer de pulmão e, posteriormente, para doenças infecciosas, sendo metodologicamente reestudado e aceito como um instrumento de investigação da patogenia da asma e DPOC. Embora, na DPOC, o EI ainda está sendo agregado como uma ferramenta para o aprimoramento do conhecimento do processo inflamatório devido a sua segurança, reprodutividade e baixo custo. A utilização do escarro induzido para avaliar a inflamação das vias aéreas em um ambiente clínico já levou a aumentos significativos da nossa compreensão da inflamação e desordem da função das vias aéreas⁶⁷. O escarro induzido aborda de forma direta e não invasiva as áreas mais afetadas, é relativamente seguro, reprodutível e tem se firmado como um método bastante adequado para diferenciação dos fenótipos, assim como para investigação repetida da inflamação brônquica⁷¹.

As dosagens de citocinas no soro e escarro em pacientes com DPOC é extremamente relevante. Autores demonstraram o aumento da concentração de interleucinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, RANTES e TNF α (fator de necrose tumoral alfa) no escarro de pacientes com DPOC comparado ao de saudáveis, e dentro do grupo de DPOC, essas medidas foram significativamente maiores nos pacientes sintomáticos em comparação com os assintomáticos, mostran-

do mais uma vez a capacidade do método em identificar situações clínicas distintas da DPOC ⁷². Dados da literatura demonstraram aumento de marcadores inflamatórios em escarro induzido, marcadores de ativação de neutrófilos e eosinófilos (mieloperoxidase, lipocalina neutrofílica humana ECP e peroxidase do eosinófilo EPO) em asmáticos e em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em comparação com saudáveis. Observaram também que as proteínas derivadas de neutrófilos estavam mais aumentadas no grupo de DPOC em relação ao grupo de asma, demonstrando mais uma forma de discriminação entre essas doenças através do escarro induzido ⁷².

Sabe-se que todo processo inflamatório é realizado com a participação de células e de seus mediadores. ⁷³ Entre estes, é importante ressaltar a participação das citocinas no processo inflamatório pulmonar, especificamente na DPOC ⁷³.

Estudos demonstraram que os neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos T CD8⁺ se encontravam aumentados no EI, o que aponta para um modelo inflamatório de envolvimento multicelular na patogenia da DPOC ⁷⁴. O melhor entendimento da fisiopatologia desta doença pode ajudar a propor novas abordagens terapêuticas ⁷⁵.

V. Casuística, Materiais e Métodos.

V. 1 - População do estudo

Os pacientes foram provenientes do ambulatório de pneumologia do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos /UFBA, Ambulatório Magalhães Neto, passaram por avaliação clínica com dois pneumologistas, com base nos parâmetros clínicos da DPOC. A amostra foi selecionada de maneira não probabilística e por conveniência. Foram avaliados inicialmente 40 pacientes. Entretanto, três pacientes foram retirados do estudo por não preencherem os critérios clínicos funcionais para DPOC.

A amostra final foi selecionada com 37 pacientes para aplicação dos questionários clínicos e exames físicos. Ademais, foram submetidos a exames de prova de função pulmonar com ênfases nos parâmetros funcionais (VEF_1 = volume expiratório forçado no 1º segundo, CVF= capacidade vital forçada e a relação $VEF_1/CVF < 70\%$ do predito), segundo o GOLD, 2010. Foram encaminhados para exames EI, *PRICK-TEST* para aeroalérgenos, coleta de 10 ml de sangue para dosagens das citocinas séricas.

V. 2. Aprovação do comitê de ética em pesquisa

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital

Universitário Professor Edgard Santos /UFBA em 20/09/2012, com o protocolo nº113\2011 e seguiu as normas e determinações em pesquisa com seres humanos da Resolução CNS196/96.

V. 3. Delineamento e local do estudo

Estudo analítico de corte transversal (série de casos) realizado em uma amostra sistemática de 37 pacientes, todos com DPOC (de acordo com a Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica GOLD, 2010). Nas avaliações das dosagens das citocinas foi realizada entre os 37 pacientes com participação de 22 indivíduos saudáveis como grupo controle. Todos pacientes foram provenientes do Serviço de Pneumologia do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos C-HUPES / Universidade Federal da Bahia/UFBA. Este estudo teve o apoio do Serviço de Imunologia do C-HUPES / UFBA.

V. 4. Critérios de inclusão

Diagnóstico da DPOC; Idade > 40 anos; Assinar e concordar com o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo); classificação de gravidade da DPOC nos estágios II, III e IV de acordo com a figura abaixo:

Vef1 pós-bd

LEVE - I	VEF/CVF < 0,70 VEF1 ≥ 80% previsto
MODERADO - II	VEF/CVF < 0,70 VEF1 ≥ 50% e < 80% previsto
GRAVE - III	VEF/CVF < 0,70 VEF1 ≥ 30% e < 50% previsto
MUITO GRAVE - IV	VEF/CVF < 0,70 VEF1 < 30% 80% previsto ou < 50% previsto + insuficiência respiratória crônica*

* PaO₂ < 60 mmHg com ou sem PaCo₂ > 50 mmHg

Classificação de gravidade da DPOC. ²

V. 5. Critérios de exclusão

Possuir comorbidades pulmonares agudas e crônicas não controladas como as especificadas: fibrose cística, bronquiectasias, sequelas de tuberculose, traqueobroncomalácia, doenças intersticiais, insuficiência cardíaca, alveolite alérgica extrínseca, pneumonite por hipersensibilidade, estenoses traqueais, tumores traqueais, corpo estranho, disfunção de cordas vocais, e hiperventilação.

V. 6- Definições de casos

Amostra foi selecionada em 37 pacientes todos com DPOC. Entretanto, após análise cuidadosa da prova de função pulmonar com base nos parâmetros do GOLD, 2010, e na resposta ao broncodilatador (BD), chegou-se a uma definição dos casos:

- **Grupo 1:** De um total de 37 pacientes avaliados 24 pacientes foram classificados como grupo 1, ou seja, foram os pacientes da amostra que tiveram reversibilidade do $VEF_1 \leq 12\%$ pós (BD).
- **Grupo 2 :** Os demais ,13 pacientes que tiveram reversibilidade do $VEF_1 \geq 12\%$ após (BD), foram classificados como grupo 2.
- **Grupo controle:** Nas avaliações dos níveis das citocinas um N de 22 indivíduos saudáveis sem DPOC e com função pulmonar normal, foi classificado como grupo controle.

V. 7. Variáveis estudadas

- **Variáveis Demográficas:** Idade, gênero, índice de massa corpórea (IMC), tabagistas, ex-tabagistas, marcos- anos.
- **Variáveis Clínicas:** Início de sintomas, saturação de O_2 , número de crises no último ano, exacerbações, idas a emergência, uso de antibióticos, corticoide sistêmico, corticoide oral.
- **Variáveis funcionais:** Parâmetros da prova de função pulmonar pré e pós broncodilatador (VEF_1 , CVF, $VEF_1/CVF\%$), estágios de gravidade da DPOC em II (moderada), III (grave) e IV(muito grave).

- **Variáveis de desfecho:** percentagem da contagem de eosinófilos, neutrófilos, positividade do *PRICK-TEST* (avaliação da atopia), níveis das dosagens de citocinas séricas e quimiocinas (IL-6, TNF- α , IL-8 e CCL-5/RANTES) pg/ml.

V. 8. Análise estatística

As medidas de tendência central utilizadas foram: médias e medianas para as variáveis demográficas e clínicas. Os dados foram analisados através do programa SPSS 17.0 para Windows. Variáveis contínuas, com distribuição não normal, foram analisadas com o teste não paramétrico *U de Mann-Whitney Test*. As análises dos valores das citocinas entre os grupos 1, grupo 2 e grupo controle, nas avaliações entre a celularidade no escarro e níveis de gravidade II, III e IV, foi utilizado o teste de *Kruskal - Wallis Test*. Nos gráficos das citocinas e quimiocinas e suas relações com os níveis de gravidade e IMC foi usado Correlação não paramétrica de *Spearman*.

V. 9. Exames, equipamentos e protocolos.

V. 9.1. Prova de função pulmonar (espirometria)

Todos os pacientes foram submetidos a exame de espirometria segundo as normas de avaliação de gravidade da DPOC do GOLD, 2010. A espirometria foi realizada com broncodilatador (sulfato de salbutamol 100mcg/

ml, Aerolin Spray® (Glaxo Smith Kline) sendo administrados 04 jatos (400mcg/ml) com auxílio do espaçador (Fumax®) após a 1ª etapa. Após o aguardo de 15 minutos os pacientes retornavam para o *recovery*. O equipamento utilizado foi o espirômetro pneumotacógrafo modelo *KOKO* e *software* (PDS Instrumentation, Inc, *Louisville,CO,EUA digidose ferraris respiratory*)

V. 9. 2. Teste cutâneo de leitura imediata (*PRICK-TEST*).

Os pacientes foram submetidos à realização do teste cutâneo de leitura imediata ou *SKIN PRICK TEST*, segundo a técnica descrita por Pepys J, 1975⁷⁶ e modificada por Osterbalee & Weeke, 1979⁷⁷ para aeroalérgenos tais como: epitélio de cão, epitélio de gato, fungos do ar (*Aspergillus fumigatus*), baratas (*Blatela germânica*, *Periplaneta americana*) e a fauna acarina (*D. pteronyssinus* e *Blomia tropicallis*) com o Kit (*Immunotech, FDA Allergenic*) Rio de Janeiro, RJ, Brasil. O teste consiste em marcar um ponto a cada 1,5 cm de intervalo, para identificar o local onde foi colocada a gota do extrato alergênico e da solução positiva (histamina) e negativa (solução salina glicerinada) no antebraço previamente limpo com álcool etílico a 90%. Com uma lanceta metálica pressionou-se firmemente e foi feita meia rotação, por um segundo, demarcando os furos na pele. Em seguida descarte da lanceta. Em cada furo foi colocado uma gota dos antígenos, sendo no primeiro furo o

controle negativo e no último o controle positivo. A leitura foi efetuada 15 a 20 minutos após a realização do teste cutâneo e a retirada do excesso de líquido com a gaze. Em seguida a pápula foi contornada com a caneta de ponta fina, tracejando o eritema, foi aplicada fita adesiva sobre a pápula e o desenho transferido para a ficha do paciente (anexo). Os resultados foram medidos em milímetros, através da média entre o maior diâmetro da pápula e o diâmetro ortogonal de seu ponto médio. Foram considerados positivo os resultados com o tamanho da pápula ≥ 3 mm para qualquer um dos antígenos aplicados.

V. 9. 3. Técnica do escarro induzido (EI)

A indução do escarro foi realizada segundo o protocolo modificado descrito por Pavord *et al*, 1997⁷⁸ com inalação de solução com salina hipertônica (3%, 5% e 7 %) em inalador ultrassônico NS, Respiramax® (Industria de aparelhos Médicos Ltda, São Paulo-SP, Brasil) de baixo débito 0,8ml/min com frequência ultrassônica de 1,7Mhz. Realizada em três etapas de 5 a 7 minutos e, em geral, foi bem tolerada. Na coleta o acompanhamento clínico-funcional (VEF₁ ou PFE) durante todo o procedimento. Queda igual ou superior a 30% do VEF₁ ou PFE, ou surgimento de sintomas intensos, a suspensão do mesmo. Nenhum paciente dos grupos apresentou redução $\leq 30\%$ do VEF₁, não sendo necessária a interrupção do exame.

O processamento do material obtido foi acondicionado em frascos estéreis, realizado com instrumentos adequados em até duas horas após a coleta, neste intervalo de tempo as amostras ficavam estocadas no refrigerador de 80L em torno de -1°C até o início do processamento. O escarro coletado foi tratado com N-aceil-L-cisteína rediluída em até quatro vezes o volume do escarro, homogeneizada delicadamente para quebra do muco e separação da saliva. Nas amostras selecionadas, foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos: centrifugação a 450 rpm por 10 minutos (*Drucker PhysiciansCentrifuge, USA*). Posteriormente após a suspensão das células foram utilizados filtros de nylon (Millipore®, 60mcm) para separação de resíduos celulares e muco. Após o processamento as amostras foi realizada a contagem global com auxílio da leitura na câmara de Neubauer com a contagem pelo cálculo (Total de células x número de quadrantes (Neubauer) x volume do escarro x 10^6) foram consideradas adequadas se houvessem células escamosas inferior a 25% e uma viabilidade celular superior a 50% e como descrito por Pizzichini *et al*, 1996⁷⁹.

Um esfregaço fino do escarro tratado em lâmina lapidada com extremidades fosca para identificação de cada paciente do estudo (nº do registro) foi realizado. Após realização do esfregaço com *swab*, as lâminas foram fixadas com Metanol e deixadas para secar a temperatura ambiente em torno de 20 a 25º em sala condicionada. As amostras foram coradas, impre-

gnadas com azul de metileno e eosina (*KIT Instant-Prov, New Prov*). Após a secagem a contagem diferencial foi realizada com auxílio de microscópio óptico.

A contagem de eosinófilos, neutrófilos, células broncoepiteliais foram contadas com manuseio do contador de células sanguíneas (Kacil, modelo (CCS-01 série nº1710-00). Os resultados foram expressos em porcentagem e transferidos para ficha de cada paciente (anexo).

V. 9.4. Dosagens das citocinas séricas e quimiocinas:

Foram coletados 10 ml de sangue periférico por técnico treinado em tubo esterilizado anticoagulante para posterior centrifugação por 10 minutos (Quest Diagnostics VanGuard V6500, Biohazard). O soro foi separado e estocado em freezer a - 20°C até as dosagens das citocinas. As citocinas e quimiocinas foram dosadas nos soros dos pacientes através do método de ELISA sanduíche de acordo com o protocolo do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Para a quantificação de TNF- α e IL-6 foram utilizados kits de alta sensibilidade (Quantikine HS ELISA). Para dosagem de CCL-5 (RANTES) e IL-8 foram utilizados os kits DuoSet ELISA.

VI. Resultados

VI. 1. Características da amostra

Algumas características demográficas, a frequência de fumantes e os resultados da função pulmonar são apresentados na Tabela 1. Não houve diferenças entre os grupos quanto à idade, sexo, percentual de fumantes ou ex-fumantes. Também não houve diferença no IMC e na saturação de oxigênio (SPO_2) nos dois grupos. A gravidade da DPOC foi avaliada por testes de função pulmonar. Todos os pacientes da amostra tinham um índice de Tiffenau ($FEV_1 / FVC\%$) $\leq 70\%$ do previsto. O VEF_1 pré / pós broncodilatador no grupo 1 foi de 48 (30-66) \ 51(35-71) enquanto que no grupo 2 foi de 35(28-44) \ 47(36-52) ($p < 0.03$). Com base no $FEV_1\%$ pós broncodilatador (BD) a função pulmonar estava mais reduzida no grupo 2, ou seja, pacientes mais obstrutivos .

Tabela 1- Dados demográficos, clínicos e espirométricos em pacientes com DPOC.

Variáveis n(%)	Grupo 1 n=24	Grupo 2 n=13	p
Gênero M\F	11\11	6\7	0,72
Idade* (anos)	66 (57-73)	69(59-76)	0,88
Fumantes	8(27,3)	4(30,8)	0,67
Ex- fumantes	16(72,7)	9(69,2)	0,43
IMC *	22(19-25)	18(18-21)	0,69
SPO ₂ *	96(94-97)	95(93-97)	0,93
Início de sintomas*	54 (42-58)	55(43-56)	0,97
VEF ₁ \CVF% pré /pos*	64(53-70)/66 (51-62)	59(53-69)/62(57-68)	0,56
VEF ₁ pré /pos*	48(30-66) /51(35-71)	35(28-42)/ 40(35-50)	0,03
CVF * pré /pos*	69 (57-84) /76(64- 89)	58(53-66)/69 (59-77)	0,12

* Valores expressos em mediana (intervalo interquartil); M: masculino F: feminino; DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica ; SpO₂: saturação periférica de oxigênio; VEF₁: volume expiratório forçado no 1º segundo, CVF: capacidade vital forçada; VEF₁ \ CVF: pré / pós : antes e depois do broncodilatador, para valor de p <0,01 foi utilizado o teste de *Mann-Whitney Sig. (2 -tailed)*.

VI. 2. Comparação da celularidade no escarro, estágios de gravidade e avaliação da atopia.

Em ambos os grupos, as contagens diferenciais de neutrófilos e eosinófilos no escarro foi realizada. O número de neutrófilos não diferiu entre os dois grupos ($p > 0,05$). No entanto, a contagem de eosinófilos foi maior ($p < 0,05$) no

grupo 2 em relação ao grupo 1. Na contagem global de células no escarro induzido o grupo 1 apresentou uma média mais alta em relação ao grupo 2, embora não houve diferença estatística ($p < 0.11$). A avaliação de atopia através do *PRICK-TEST* não mostrou diferença entre os grupos por positividade para qualquer dos antígenos. No grupo 1 cinco pacientes (21%) tiveram teste positivo e no grupo 2, em quatro pacientes (31%). É importante dizer que nenhum dos pacientes do grupo 1 e 2 tinha histórico de asma.

A gravidade da DPOC foi determinada de acordo com as diretrizes do GOLD, 2010. Os pacientes do grupo 1 nos estágios II, III e IV foram 6 (27,3%), 12 (50%) e 6 (27,3%), respectivamente. No grupo 2, houve mais pacientes nos estágios mais grave da DPOC, no estágio III 12 (92,3%) e no estágio IV 1 (7,7%) (Tabela 2).

Tabela 2- Valores da contagem celular no escarro induzido (EI), estágios de gravidade e resultados do teste alérgico nos pacientes com DPOC.

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	p
n(%)	n=24	n =13	
Total células x(10 ⁶ /ml)*	834.441	200.504	0,11
Neutrófilos*	36,95±15,83	38,77± 16,16	0,67
Eosinófilos*	4,45±7,63	9,46±7,42	0,05
Estágio II (GOLD)	6(27,3)	0	0,03
Estágio III (GOLD)	12(45,5)	12(92,3)	0,77
Estágio IV (GOLD)	6(27,3)	1(7,7)	0,43
PRICK -TEST (+)	5(20,8)	4(30,8)	0,58
PRICK- TEST (-)	17(70,8)	9(69,2)	0,09

* Valores expressos média ± desvio padrão; Prick-test (+): teste cutâneo positivo; Prick-test (-): teste negativo; DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; II- estágio dois; III: estágio tres; IV: estágio quatro; GOLD: Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; p-valor foi utilizado o Teste de Mann-Whitney Sig. (2 -tailed)

VI. 3. Correlação entre os estágios de gravidade e os valores de neutrófilos e eosinófilos no escarro.

O número de neutrófilos e de eosinófilos no escarro de acordo com a gravidade da DPOC estão na Tabela 2. Apesar dos neutrófilos estarem elevados com a gravidade da DPOC com maior número desta célula no estágio

III, os eosinófilos não foram detectadas em doentes com estágio III da DPOC.

Tabela 3- Contagem de neutrófilos e eosinófilos no escarro versus estágios da DPOC

Escarro	Estágios de gravidade da DPOC			p
	II n=6	III n=24	IV n=7	
Neutrófilos	30,5(24,7-40,2)	34,5(23,5-44,5)	44(25,0-56,0)	0,55
Eosinófilos	4(0-12)	6(0-12)	0(0-0)	0,01

Valores expressos em mediana e intervalo interquartil; DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; II-estágio dois; III: estágio três; IV: estágio quatro; valores de p *Kruskal-Wallis test Sig. (2-tailed)*; $p < 0,01$

VI. 4. Relação entre os estágios e os parâmetros de gravidade da DPOC.

Foram utilizados neste estudo como parâmetros de gravidade a intensidade da limitação do fluxo aéreo classificado pelo GOLD, 2010 (VEF_1 , CVF e $VEF_1/CVF\%$). Esta avaliação se refere a amostra total. Os pacientes não estão separados nos grupos 1 e 2 (Tabela 4). Os valores do VEF_1 apresentam uma redução no estágio IV em relação as demais estágios de gravidade da doença. Os pacientes do estágio IV apresentam também uma CVF mais reduzida demonstrando que estes pacientes estavam mais obstrutivos. O estágio III foi o estágio com maior número de pacientes em relação aos de-

mais, demonstrando que os pacientes do estudo em sua maioria já se encontrava no estágio grave da doença.

Tabela 4 - Dados do teste função pulmonar (espirometria) versus estágios da DPOC na amostra total.

Dados (pre\ pós BD)	Estágio da DPOC			p
	II n=6	III n=24	IV n=7	
VEF ₁	67,8\69,6 (±12,6\±12,3)	43,9\49,5 (±14,9\±14,1)	31\29,8 (±7,9\±7,6)	0,157 0,133
CVF	82,8\86,6 (±16,6\±13,8)	68,4\76 (±13,4\±11,7)	54,7\58,8 (±13,5\±13,9)	0,233 0,282
FEV ₁ \CVF%	69,3\70 (±7,3\±6,6)	60,4\62 (±14,4\±12,8)	57,7\57,4 (±8,8\±10,6)	0,324 0,111

Valores expressos em media e desvio padrão; BD: broncodilator; VEF₁-Volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF-Capacidade vital forçada; VEF₁ \ CVF- Índice de Tiffeneu; p values *Kruskal-Wallis test Sig. (2 - tailed)*; p <0.01.

VI. 5. Relação do número de internações, visitas a emergência e uso de medicamentos no último ano versus os estágios da DPOC.

Estes resultados expressam análise dos prontuários e relato no último ano dos pacientes mediante resposta a ficha clínica (anexo). Estes dados expressam o uso de medicamentos antes da participação no estudo, idas a

emergência e internamentos. Não houve diferenças estatísticas quanto ao uso de corticoide inalatório e sistêmico nos grupo II, III e IV de gravidade. Entretanto, na avaliação do número de visitas a emergência e internamentos último ano o estágio III (grave) foi o que apresentou o maior percentual de pacientes.

Tabela 5 - Dados do uso de medicação, hospitalização e visitas a emergência

Dados* (%)	Estágios DPOC n=37 n (%)			p
	II n=6	III n=24	IV n=7	
Antibióticos	1(16)	0	0	0,68
β2-agonista curta	0	2(8,1)	2(28,6)	0,24
β2-agonista longa	2(32,3)	2(8,1)	1(14,3)	0,52
Corticoide inalatório	2(32,3)	4(16,2)	2(28,6)	0,37
Corticoide sistêmico	1(16)	1(4,5)	0	0,56
Visitas a emergência	2(32,3)	8(32,4)	3(42,9)	0,22
Hospitalização	3(50)	12(50)	3(42,9)	0,09

Valores expressos em porcentagem; *dados no último ano. Valores de p *Kruskal-Wallis test Sig. (2 - tailed)*; $p < 0.05$.

VI. 6. Comparação dos níveis das citocinas séricas TNF e IL-6 entre os grupos 1, 2 e grupo controle.

Os níveis de TNF no grupo 1 foi 2,9 (0,95-6,03 pg / ml) e o grupo 2 com 3,2 (2,65-5,50 pg \ ml) foi superior ($p < 0.01$) do que nos controlos 0,35 (0-1,9 pg / ml). Os níveis de IL-6 também foram maiores no grupo 1 com 1,4 (0,42-2,10 pg / ml) e grupo 2 com 0,92 (0,37-1,89 pg \ ml) ($p < 0.01$) do que nos controlos (0-0 pg / ml) (Gráfico 1 a, b).

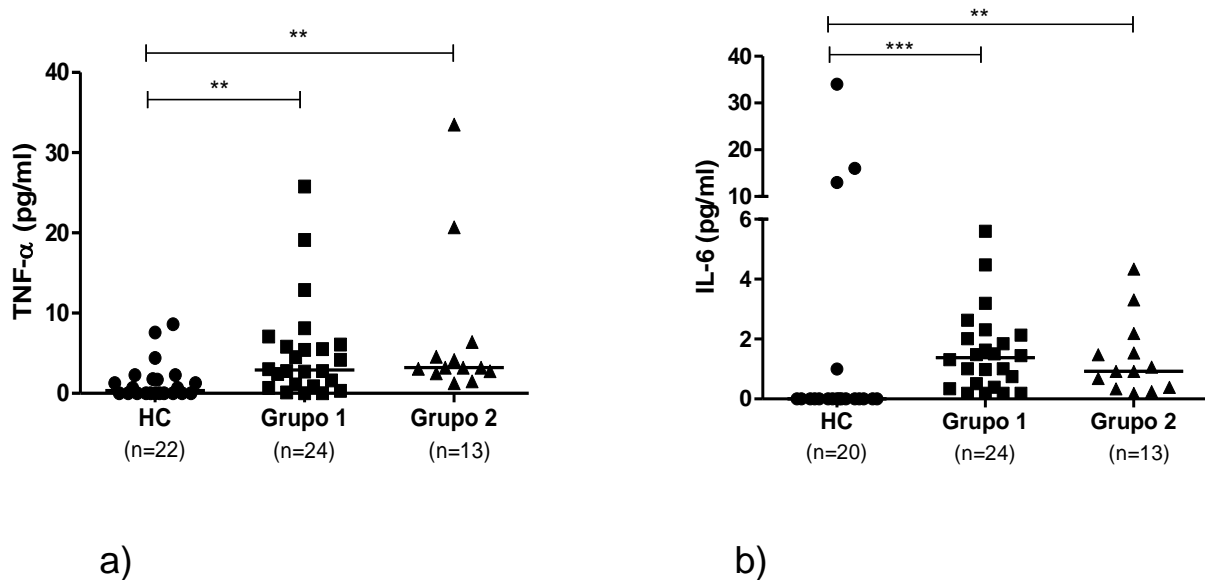


Gráfico 1 (a, b) - Níveis séricos das citocinas (pg/ml) TNF-α e a IL-6 em pacientes portadores de DPOC no grupo 1, grupo 2 e indivíduos saudáveis como grupo controle (HC). Os resultados são mostrados em dot-plot. Foi utilizado para os valores de p, *Kruskal-Wallis test* seguido pelo pós-teste *Dunn's Multiple Comparison Test* ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

VI.7. Comparação dos níveis séricos das quimiocinas IL-8 e RANTES/CCL-5 entre os grupos 1, grupo 2 e grupo controle.

Os níveis de IL-8 foi superior ($p < 0.05$) no grupo 1 do que nos controles e não houve diferença ($p > 0.05$) em níveis CCL5 entre os grupos com DPOC e HC. Os valores medianos da IL-8 foram de 0 (0-51,75); 0 (0-57,50) e 0 (0-0) para os dois grupos e controles respectivamente com diferença estatística entre o grupo 1 e os controles ($p < 0.05$) (Figura 2a). Não havia nenhuma diferença nos níveis séricos da quimiocina CCL-5, entre os três grupos (Figura 2b).

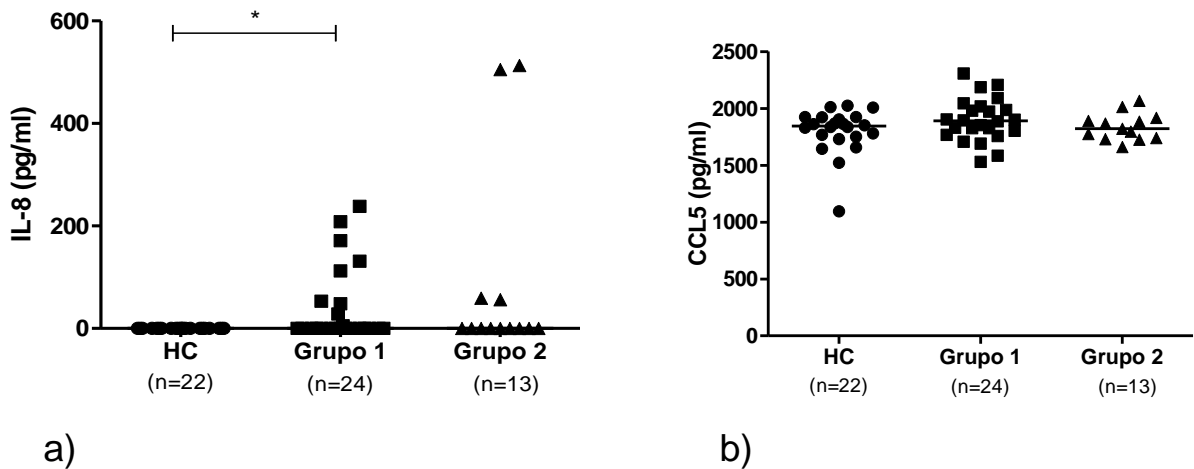
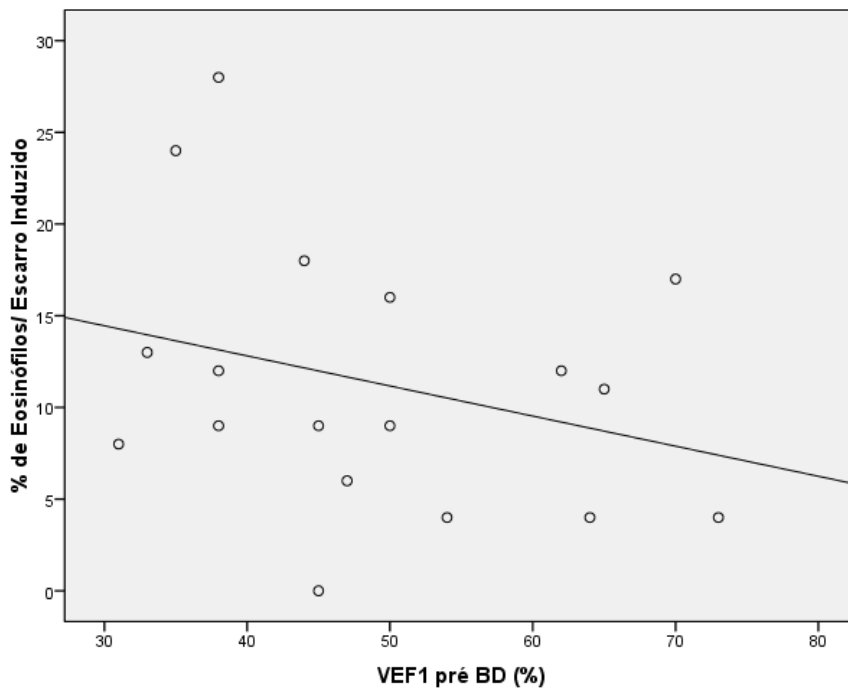


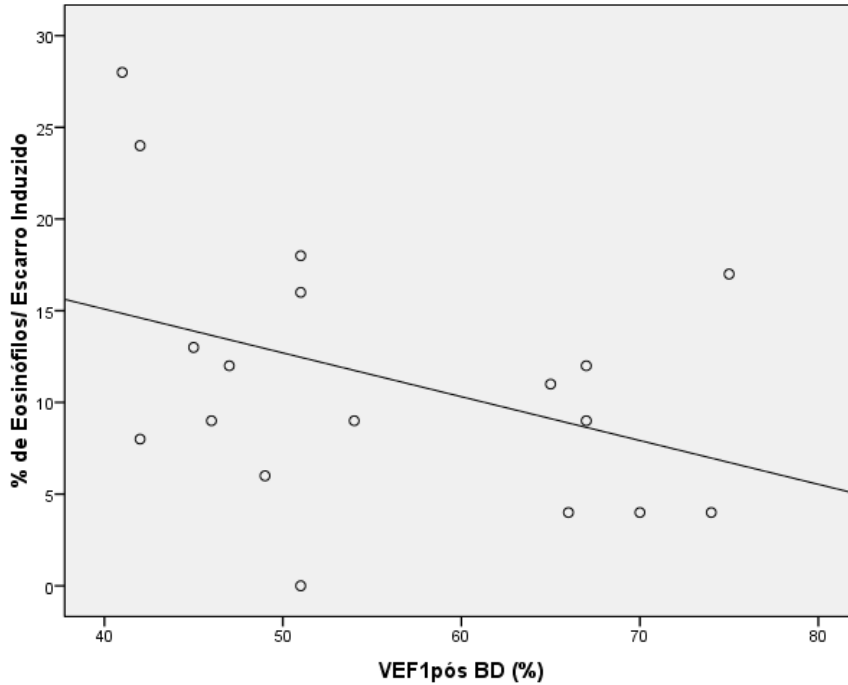
Gráfico 2 (a, b)- Níveis séricos das quimiocinas (pg/ml) IL-8 e a CCL-5 em pacientes portadores de DPOC no grupo 1, grupo 2 e indivíduos saudáveis como grupo controle (HC). Os resultados são mostrados em *dot-plot*. Foi utilizado para os valores de p *Kruskal-Wallis test* seguido pelo pós-teste *Dunn's Multiple Comparison Test* * $p < 0.05$.

VI. 8. Correlação entre a porcentagem de eosinófilos no escarro e o parâmetro de gravidade VEF₁.

Nesta avaliação os pacientes não estão divididos nos grupos 1 e 2. Contudo, foram avaliados os eosinófilos no total dos 37 pacientes, correlacionando com o parâmetro de gravidade volume expiratório no 1º segundo (VEF₁) pré e pós (BD). A média de eosinófilos total foi de $15 \pm 9,42$.



a)*



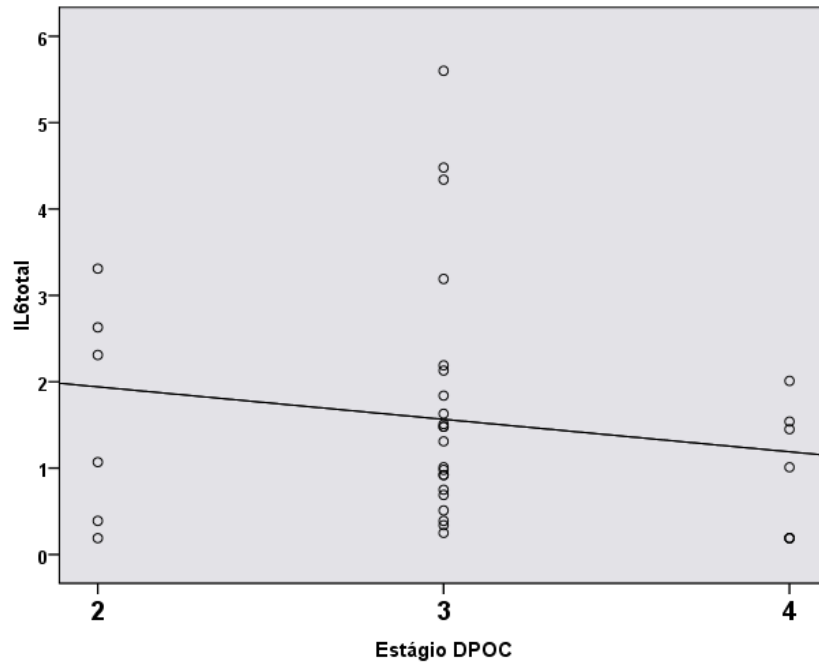
b)*

Gráfico 3 (a, b) -Porcentagem de eosinófilos no escarro e os valores do VEF₁ pré e pós broncodilatador dos pacientes com DPOC, incluindo o grupo 1 e grupo 2 numa avaliação total. Os resultados são mostrados em gráfico de dispersão de pontos. Foi utilizado o teste estatístico *Correlation Coefficient Spearman Sig(2-tailed)*. * $p < 0.01$.

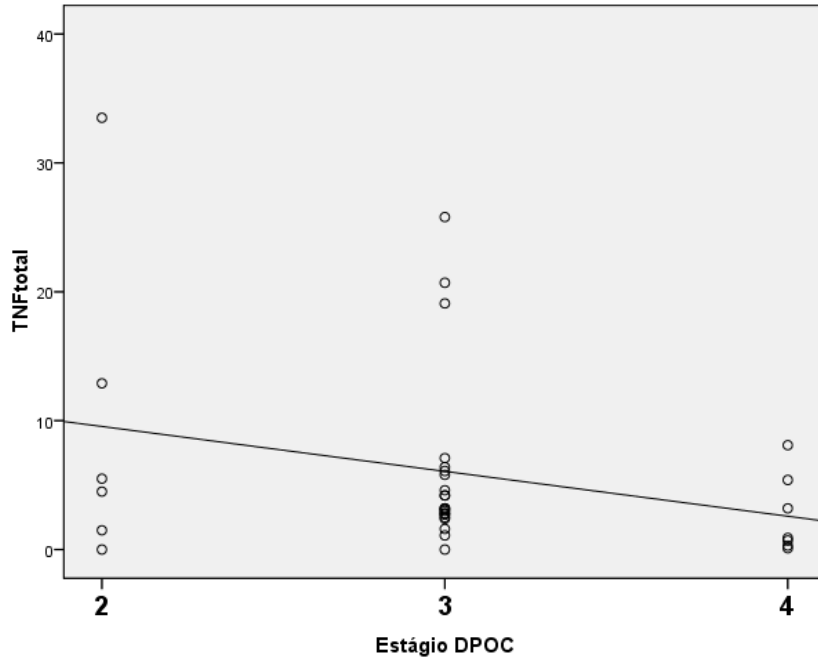
VI. 9. Correlações entre os níveis das citocinas séricas IL-6, TNF e as quimiocinas IL-8 e CCL-5 com os estágios de gravidade da DPOC.

Não houve correlação significativa entre o TNF- α , IL-8 e CCL5 com a gravidade da DPOC. Entretanto, em vez de uma associação direta houve uma correlação inversa entre os níveis de IL-6 e a gravidade da DPOC (Gráfico 5a-

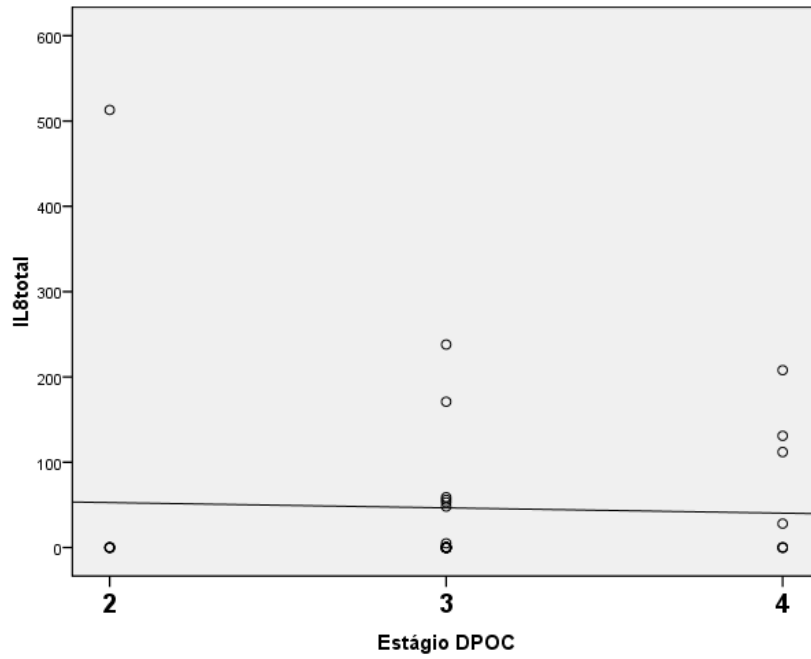
c)



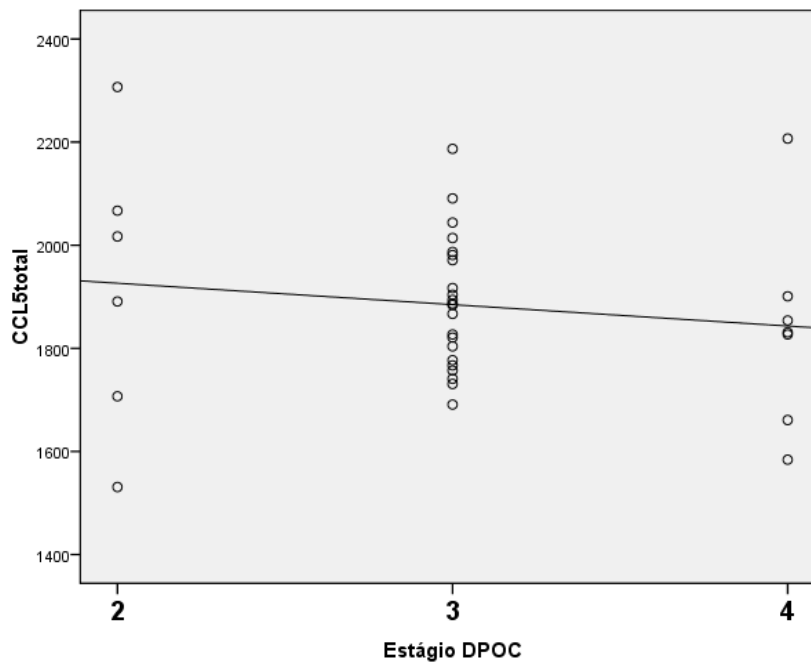
a) $p < 0.01$



b) $p < 0.37$



c) $p < 0.52$

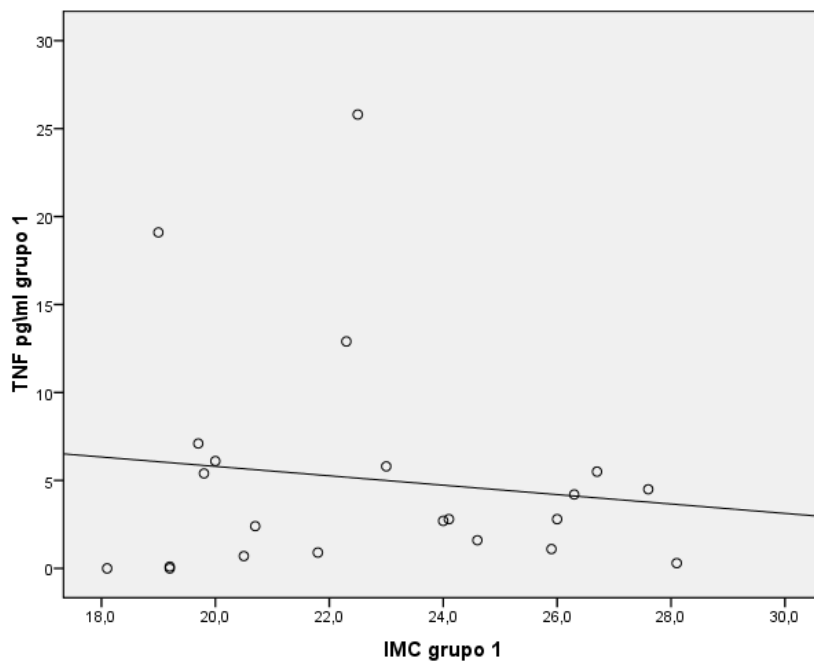


d) $p < 0.77$

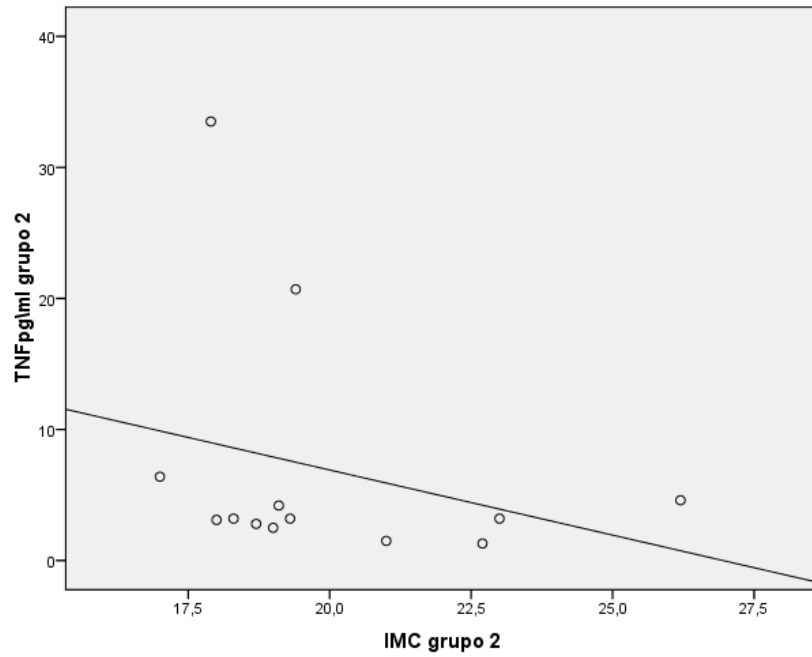
Gráfico 4 (a, b, c, d) - Relação entre os níveis séricos das interleucinas IL- 6, TNF e as quimiocinas IL-8 e CCL-5 com os estágios de gravidade da DPOC. Os resultados são mostrados em gráfico de dispersão de pontos. Foi utilizado *Correlation Coefficient Spearman Sig(2 –tailed)*. * $p < 0.01$.

VI. 10. Relação do nível sérico do TNF com Índice de Massa Corpórea (IMC) entre os grupos 1, grupo 2 e o total de pacientes.

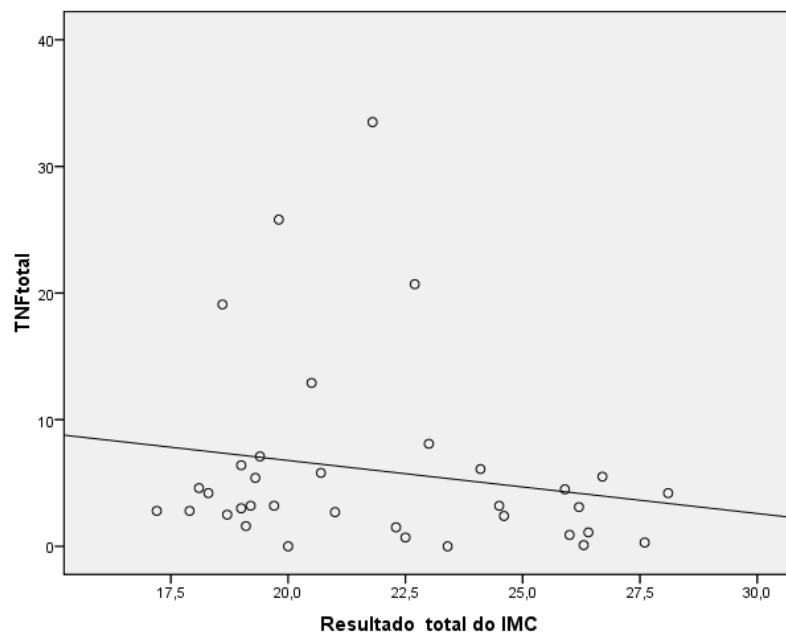
Na análise do índice de massa corporal o grupo 2 estava menor ($19,9 \pm 2,5$) em relação ao grupo 1. Não houve uma diferença estatística entre os grupos. (Tabela 1). As correlações entre os níveis séricos de TNF e IMC dos pacientes do grupo 1 e 2 são mostrados no gráfico 5. Houve uma correlação inversa entre TNF e IMC no grupo 2 e no total da amostra (Gráfico 5 b,c).



a)



b) * $p < 0.01$



c)* $p < 0.01$

Gráfico 5 (a, b, c) - Relação entre o nível sérico de TNF e os valores do IMC nos grupo 1, grupo 2 e total de pacientes com DPOC. Os resultados são mostrados em gráfico de dispersão de pontos. Foi utilizado *Correlation Coefficient Spearman Sig(2-tailed)*. * $p < 0.01$.

VII. Discussão

A DPOC está em 4º lugar entre as principais causas de morte nos Estados Unidos⁸⁰. Ambas, a prevalência e mortalidade associadas à DPOC continuam a subir. Além disso, a DPOC tornou-se uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo⁸¹. Historicamente, a incidência da DPOC é maior entre os homens do que entre as mulheres. Depois de várias décadas, a incidência da DPOC na população feminina começou a subir rapidamente. Hoje, alguns especialistas sugerem que as mulheres, na verdade, pode ter aumento da susceptibilidade a DPOC do que os homens, embora esta posição é controversa. Em 2000, mais mulheres do que homens morreram de DPOC nos Estados Unidos⁸². Entre os pacientes com DPOC grave início precoce, tem sido relatado à predominância feminina⁸³. Em nosso estudo, não observamos diferenças na prevalência da DPOC entre homens e mulheres.

O tabagismo é o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento da DPOC. Os efeitos do fumo no declínio da função pulmonar dependem da intensidade de exposição à fumaça⁸⁴. Embora exista um risco claramente aumentado associado com a exposição mais intensa ao fumo, apenas uma minoria dos fumantes desenvolvem a DPOC grave⁸⁵.

No presente estudo, o percentual de fumantes e ex-fumantes foram semelhantes em ambos os grupos.

A análise do escarro é uma ferramenta útil na avaliação da inflamação da via aérea ⁸⁶. O EI foi inicialmente utilizada para o diagnóstico de câncer de pulmão e, posteriormente, para doenças infecciosas. No início da década de 1990, este método foi utilizado na investigação de inflamação brônquica associada com asma⁶⁶. Mais recentemente, tem sido utilizado para a investigação da patogênese da asma e DPOC, devido à sua segurança, reprodutibilidade e baixo custo. No nosso estudo, foi possível avaliar a celularidade, realização da indução sem nenhum evento adverso relatado, comprovando a segurança da técnica.

A inflamação neutrofílica com a liberação de elastase de neutrofílica, fosfatase ácida e mieloperoxidase são características da DPOC ¹³. O papel dos eosinófilos no escarro dos pacientes com DPOC não é clara. Inicialmente pensava-se que a presença de eosinófilos estava relacionada com um subgrupo de pacientes com DPOC com características da doença asmática ¹⁴. Estudos mostram que até 40% dos pacientes com DPOC apresentam uma quantidade de eosinófilos aumentada no escarro¹⁴. A presença de eosinófilos no escarro dos pacientes com DPOC também foi associada com uma melhor

resposta à terapia de corticosteróides⁸⁷. No presente estudo, o percentual de eosinófilos foi maior no escarro dos pacientes que tiveram reversibilidade do VEF₁ pós broncodilatador e o percentual de eosinófilos no escarro estava numa correlação invertida relacionado com o VEF₁. Isto indica que estes pacientes tinham a hiper-reatividade brônquica maior. Embora tenhamos observado anteriormente que uma grande porcentagem de pacientes com eosinofílica nasal teve associação com atopia como no trabalho publicado por Neves et al, 2013⁵¹. Nós não mostramos uma relação entre atopia ou asma com a reversibilidade do VEF₁ na DPOC.

Dados não publicados de um estudo multicêntrico em cidades latino-americanas mostrou que 13,2% da população com DPOC apresentam um perfil misto de asma e DPOC. Seus dados podem ajudar no desenvolvimento de estratégias para o manejo terapêutico da DPOC^{88, 89}. Nossos dados argumentam contra a associação de asma em pacientes que tiveram reversibilidade do VEF₁ pós broncodilatador. Em primeiro lugar, nenhum dos pacientes tinham história prévia de asma e não tinham história familiar de asma. Além disso, baseado no *PRICK-TEST* a prevalência de atopia foi semelhante nos dois grupos de DPOC. Na verdade, o perfil imunológico em relação citocina e quimiocina produzidas foi semelhante em ambos os grupos

e não houve aumento na CCL5 uma quimiocina típica Th2 nestes pacientes. A inflamação local neutrofílica é a característica fundamental da DPOC, juntamente com o aumento de mediadores inflamatórios das vias aéreas, bem como no sangue circulante ²³. Os neutrófilos foram a célula predominante na expectoração e não houve diferença na frequência de neutrófilos entre os dois grupos. Não se pode excluir que a solução salina hipertônica utilizado na técnica de expectoração induzida pode ter aumentado o número de neutrófilos que foram documentados ⁹⁰.

O aumento dos níveis de IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-8 foram observados no escarro induzido de pacientes com DPOC estável ⁹¹. Há também evidências da relação entre níveis de citocinas em pacientes com DPOC fumantes ^{92,93}. No entanto, a relação destas quimiocinas com eosinófilos no escarro com ou reversibilidade VEF₁ não foram avaliadas. No nosso estudo, foi possível avaliar os níveis de citocina IL-6, TNF- α , e quimiocinas IL-8 e RANTES / CCL-5 na DPOC com quem tinha ou não reversibilidade do VEF₁ após BD.

A IL-6 é considerada por muitos autores como o melhor biomarcador de gravidade quando associada a níveis de obstrução das vias aéreas. A IL-6 é considerada pelos autores como o biomarcador primário da inflamação asso-

ciada com a mortalidade ¹⁸. A IL-6 participa diretamente na inflamação da DPOC ⁹⁴. Não encontramos associação relevante entre IL-6, IL-8, TNF e CCL5 com a níveis de gravidade da DPOC. Relevante foi a documentação de uma correlação inversa entre os níveis séricos de TNF e IMC.

Outro dado relevante da nossa pesquisa e voltada para os neutrófilos que na DPOC tem um papel com eventos marcantes dentro do contexto inflamatório. Um estudo publicado por Rufino *et al* em 2007 ⁶ mostrou que o percentual de neutrófilos foi significativamente maior no material recolhido dos pacientes com DPOC em relação ao encontrado no escarro dos tabagistas e não-fumantes . Em nosso estudo, o percentual de neutrófilos no escarro, tanto no grupo 1 e grupo 2 apresentaram um percentual alto deste componente inflamatório sem diferença significativa entre os grupos. A principal justificativa para este refere-se à rápida migração de neutrófilos do vaso para as vias aéreas, tornando-o mais fácil de encontrá-los no interior das vias respiratórias do que na parede ou parênquima pulmonar brônquica. Além disso, existe a possibilidade de uma solução salina hipertônica utilizado na técnica de expectoração induzida ser capaz de aumentar o número de neutrófilos ⁹⁰. Outro fato que podemos explicar em nosso estudo é que o percentual alto de neutrófilos possa está implicado com a degranulação de eo-

sinófilos com uma possível ação da proteinase elastase neutrofílica. Nossa hipótese é que esta proteína possa está elevada em nossos pacientes relacionados com aumento de neutrófilos, embora tenhamos não mensurados os seus níveis, mas a presença do componente inflamatório neutrofílico no EI em ambos os grupos foi alta. Já existe na literatura científica dados que foram discutidos por outros autores sugerindo que os pacientes com DPOC apresentam níveis elevados de proteínas eosinofílicas no sangue periférico, como resultado da degranulação. É possível que esta degranulação ocorra devido à ação da elastase neutrofílica, o qual costuma está elevada em pacientes com DPOC ³⁰. Esta degranulação pode influenciar os eosinófilos não serem vistos na lâmina o que pode explicar no nosso estudo a ausência desta célula no estágio IV de gravidade da DPOC.

VIII. Conclusão

1. Os neutrófilos foram o tipo de célula predominante em ambos os grupos de pacientes com DPOC independentes da reversibilidade do VEF₁.
2. A história anterior de atopia, positividade dos níveis *PRICK -TEST* e CCL5 não estão associados a pacientes com DPOC que tinham reversibilidade do VEF₁.
3. Os pacientes que tiveram reversibilidade do VEF₁ têm DPOC mais grave. Tinham função pulmonar mais reduzida e são mais obstrutivos.
4. Houve uma correlação inversa com os níveis séricos de TNF com níveis mais baixos de IMC

IX. Limitações do estudo

A adoção de uma amostra de conveniência pode ter influenciado nos resultados. O tamanho da amostra relativamente pequena para ambos os grupos avaliados, podem ter influenciado em alguns valores sem diferenças estatísticas .

X. Perspectivas futuras

No futuro e possível doutorado, pretendo dosar a elastase neutrofílica e associar com os níveis de gravidade da doença, que segundo a literatura costumam está elevadas no sangue em pacientes com DPOC. Este novo trabalho, pretende esclarecer e contribuir para literatura científica que das proteinases liberadas pelo neutrófilo durante o processo inflamatório na DPOC, a elastase neutrofílica é mais implicada com os aspectos de gravidade e perpetuação do processo inflamatório.

XI. Summary

Characterization of Inflammatory Profile in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and its Relationship with Gravity and Reversibility of Forced Expiratory Volume in One Second (FEV₁)

Objective: To evaluate if the frequency of eosinophils and neutrophils by the analysis of sputum and serum cytokines with the severity of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods:** This is a cross-sectional study performed in of 37 patients, with COPD (according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease GOLD, 2010). The patients answered a questionnaire had physical examinations perform and underwent test of pulmonary function tests with emphasis on functional parameters from forced expiratory volume in one second (FEV₁), forced vital capacity (FVC) and (FEV₁ / FVC) <70% predicted according to GOLD, 2010. Analysis of the cellularity the induced sputum (IS) was performed by microscopy after citocentrifugation of the material and Prink test to allergens was done. Serum cytokine levels were determined by ELISA. **Results:** Patients were classified in two groups based on the FEV₁ after bronchodilator

In 24 patients (group 1) there was no significant therapy after bronchodilator and 13 patients had a response with a mean $\geq 12\%$ reversibility and were classified as group 2. The parameters of severity assessed by pulmonary function test results were as follows: all patients in the sample were with $(FEV1 / FVC \%) \leq 70\%$ predicted and predicts the GOLD guidelines, 2010 (Table 1). The FEV1 pre / post bronchodilator in 1 second in group 1 had a median of 48 (30-66) \ 51 (35-71), while in the group 2 the was and 35 (28-44)\ 47 (36-52) ($p < 0.03$). The severity of COPD was determined according to the guidelines of the Global Initiative for COPD (GOLD). The number of patients in the group 1 in the stage II, III and IV were 6 (27.3%), 12 (50%) and 6 (27,3%) respectively in group 2 and zero, 12 (92,3%) and 1 (7.7%). TNF and IL-6 serum levels were higher in patients with DPOC than in controls ($p < 0.001$) with no difference between group 1 and 2. IL-6 level was higher in patients of group 1 than controls ($p < 0.001$). There was an inverse correlation between TNF and IL-6 levels and severity of the DPOC as well as in inverse correlation between TNF levels and BMI in both groups.

Conclusion: 1-The severity of COPD was more associated with the percentage of neutrophils than eosinophils in the sputum; 2- Eosinophils were not associated to atopy. 3- DPOC is associated with increasing in IL-1, IL-6

and TNF in serum. 4-Serum TNF was increased correlated with BMI.

Keywords: COPD, inflammation, eosinophil, neutrophil, cytokine.

XII. Referências Bibliográficas

1. GOLD - Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease [Homepage on the Internet]. Executive Summary, Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD Updated 2005.
2. Global initiative for chronic obstructive lung disease. [Homepage on internet]. Available from: <http://www.goldcopd.org/guidelines-global-strategy-for-diagnosis-management.html>. [Updated 2011 December. Cited 2012 Jul 09].
3. Ministério da Saúde - DATASUS. (Accessed 2010 - abril, at www.datasus.gov.br).
4. Menezes AMB, Jardim JR, Padilla RP, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: The PLATINO Study in São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2005; 21(5): 1565-1573.
5. Jardim JR, Oliveira J, Nascimento O. II Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004; 30: 1- 42.
6. Rufino R, Costa CH, Souza HSP, Madi K, Lapa e Silva JR. Perfil celular do escarro induzido e sangue periférico na doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007; 33(5): 510-518.
7. Rogério Rufino, Cláudia Henrique da Costa. Patogenia da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Revista HUPE*, Rio de Janeiro, 2013; 12(2): 19-30.
8. Moreira, M.A.C. Alterações pulmonares espirométricas e tomográficas após exposição à fumaça da combustão de lenha (manuscrito) 145f. 2011.
9. Walker RI, Willemze R. Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. *Reviews Infectious Disease*. 1980; 2(2): 282-92.

10. Cosio M, Ghezzo H, Hogg JC, Corbin R, Loveland M, Dosman J, et al. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *New England Journal of Medicine*. 1978; 298(23): 1277-81.
11. Cosio MG, Majo J, Cosio MG. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest*. 2002; 121(5):160-165.
12. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, et al. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1994; 150(6 Pt 1):1646-52.
13. Saetta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999; 160(5 Pt 2):17-20.
14. Brightling CE, Monteiro W, Ward R, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, et al. Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Lancet*. 2000; 356:1480-5.
15. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacological Reviews*. 2004; 56(4): 515-48.
16. Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, Saetta M. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006; 174(1):6-14.
17. Jeffery PK. Inflammation in chronic obstructive lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999; 160: 3-4.
18. Celli BR, Locantore N, Yates J, Tal-Singer R, Miller BE, Bakke P et al. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2012; 185(10):1065-72.

19. Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *European Respiratory Journal*. 2005 ;26(5):835-45.
20. Saetta M, Turato G, Zuin R. Structural basis for airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders*. 2000; 17(3):239-45.
21. Lapperre TS , Postma DS, Gosman MM, Snoeck-Stroband JB, ten Hacken NH, Hiemstra PS, et al. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax*. 2006; 61(2):115-21.
22. Dourado Victor Zuniga, Tanni Suzana Erico, Vale Simone Alves, Faganello Márcia Maria, Sanchez Fernanda Figueirôa, Godoy Irma. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2000; 32(2): 161-171.
23. Moermans C, Heinen V, Nguyen M, Henket M, Sele J, Manise M, Corhay JL, Louis R. Local and systemic cellular inflammation and cytokine release in chronic obstructive pulmonary disease. *Cytokine*. 2011; 56(2): 298-304.
24. Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, et al. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax*. 2002; 57(5): 405-11.
25. Hulbert WM, McLean T, Hogg JC. The effect of acute airway inflammation on bronchial reactivity in guinea pigs. *American review of respiratory disease*. 1985; 132:7-11.
26. Holz O, Seiler T, Karmeier A, Fraedrich J, Leiner H, Magnussen H, et al. Assessing airway inflammation in clinical practice - experience with spontaneous sputum analysis. *BMC Pulmonary Medicine*. 2008; 28:5.

27. Breuer R, Christensen TG, Lucey EC, Stone PJ, Snider GL. An ultrastructural morphometric analysis of elastase-treated hamster bronchi shows discharge followed by progressive accumulation of secretory granules. *American review of respiratory disease*.1987; 136:698-703.
28. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*. 2006; 61:448-54.
29. Turato G, Zuin R, Saetta M. Pathogenesis and pathology of COPD. *Respiration*. 2001; 68:117-28.
30. Liu H, Lazarus SC, Caughey GH, Fahy JV. Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro. *American Journal of Physiology*.1999; 276:28-34.
31. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation,immunity, and tissue repair and destruction. *European Respiratory Journal*. 2008; 31:1334-56.
32. Hurd S: The impact of COPD on lung health worldwide: epidemiology and incidence. *Chest*. , 2000.117(2):1S.
33. Senior RM, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease. *ACP Medicine*. 2007; 1-18.
34. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005; 2(4):258-66.
35. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal*. 2003; 22(4):672-88.
36. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinics in Chest Medicine*. 2007; 28(3): 479-513.

37. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004; 59(7): 574-8.
38. Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999; 159(2):473-9.
39. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal* 2009; 33(5): 1165-85.
40. Celli BR. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: common pathogenesis, shared clinical challenges. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2012; 9(2):74-9.
41. Casanova C, Cote C, Torres JP, Aguirre-Jaime A, Marin JM, Pinto-Plata V et al. Inspiratory-to-total lung capacity ratio predicts mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005; 171: 591-7.
42. Stockley RA, Mannino D, Barnes PJ. Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009; 6(6): 524-6.
43. Fabbri LM, Rabe KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? *Lancet*. 2007; 370:797-9.
44. Cosio BG, Agustí A. Update in chronic obstructive pulmonary disease 2009. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010; 181(7):655-60.
45. Tsoumakidou M, Tsiligianni I, Tzanakis N. Mechanisms of altered cell immunity and cytotoxicity in COPD. *Current Drug Targets*. 2011; 12(4): 450-9.

46. Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *European Respiratory Journal*. 2008; 32(4):962-9.
47. Gibson PG, Simpson JL. The overlap syndrome of asthma and COPD: what are its features and how important is it? *Thorax*. 2009.64(8): 728-35.
48. Soriano JB, Visick GT, Muellerova H, Payvandi N, Hansell AL. Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest*. 2005; 128(4):2099-107.
49. Weatherall M, Shirtcliffe P, Travers J, Beasley R. Use of cluster analysis to define COPD phenotypes. *European Respiratory Journal*. 2010; 36(3): 472-4.
50. Ahmed T, Krieger BP, Wanner A. Differential diagnosis of asthma in the elderly. *Asthma in the Elderly*. 1997; 93:120.
51. Neves Margarida Celia Lima Costa, Neves Yuri Costa Sarno, Mendes Carlos Mauricio Cardeal, Bastos Monalisa Nobre, Camelier Aquiles Assunção, Queiroz Cleriston Farias et al. Avaliação de atopia em portadores de DPOC. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2013; 39(3): 296-305.
52. Pessoa CLC, Pessoa RS. Epidemiologia da DPOC. *Pulmão RJ - Atualizações Temáticas*. 2009; 1(1): 7-12.
53. Jardim JR, Oliveira J, Nascimento O. II Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004; 30:1-42.
54. Buffels J, Degryse J, Heyrman J, Decramer M. Office spirometry significantly improves early detection of COPD in general practice: the DIDASCO Study. *Chest*. 2004; 125:1394-9

55. van der Meer RM, Wagena EJ, Ostelo RW, Jacobs JE, van Schayck CP. Smoking cessation for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2003; (2).
56. Orie NG, Sluiger HJ, De Vries K, et al. The host factor in bronchitis. In Orie NGM, Sluiter HJ, editors: *Bronchitis, An International Symposium*. Netherlands. 1961; 43-59.
57. O'Connor GT, Sparrow P, Weiss ST. The role of allergy and nonspecific airway hyperresponsiveness in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *American review of respiratory disease*. 1989; 140(6): 225-32.
58. Postma DS, De Vries K, Köeter GH, Sluiter HJ. Independent influence of reversibility of airflow obstruction and nonspecific hyperreactivity on the long-term course of lung function in chronic airflow obstruction. *American review of respiratory disease*. 1986; 134(2): 276-80.
59. C. M. Fletcher, P. C. Elmes, A. S. Fairbairn, C. H. Wood. Small right arrow pointing to. *British Medical Journal*. 1959; 2(5147): 257–266.
60. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology*. 2008; 8:183-92.
61. Global Initiative for Asthma (GINA), Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). [Homepage on the Internet]. *Diagnosis of Diseases of Chronic Airflow Limitation: Asthma, COPD and Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS)*. 2014. available at <http://www.ginasthma.org>; available at <http://www.goldcopd.org>.
62. Han MK. Update in chronic obstructive pulmonary disease in 2010. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011; 183(10):1311-5.
63. Han MK, Agusti A, Calverley PM, et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010; 182(5): 598–604.
64. Hurst JR. The rhythm of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Journal Clinical Epidemiologic*. 2010; 63(12): 1285-6.

65. Brightling CE, Monterio W, Green RH, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, Pavord D. Induced sputum and other outcome measures in chronic obstructive pulmonary disease: safety and repeatability. *Respiratory Medicine* . 2001; 95(12): 999-1002.
66. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992; 47(1): 25-9.
67. Pin I, Freitag AP, O'Byrne PM, Girgis-Gabardo A, Watson RM, Dolovich J, Denburg JA et al. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *American review of respiratory disease* .1992 ;145(6):1265-9.
68. Fahy JV, Schuster A, Ueki I, Boushey HA, Nadel JA. Mucus hypersecretion in bronchiectasis. The role of neutrophil proteases. *American review of respiratory disease*. 1992; 146(6): 1430-3.
69. Fireman E, Toledano B, Buchner N, Stark M, Schwarz Y. Simplified detection of eosinophils in induced sputum. *Inflammation Research (IR)* 2011; 60(8):745-50.
70. Quirce S, Lemièrre C, de Blay F, del Pozo V, Gerth Van Wijk R, Maestrelli P et al. Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *Allergy*. 2010; 65(4): 445-58.
71. Eduardo Costa, José Angelo Rizzo, Adelmir de Souza Machado, Alfeu T. França, Flávio Sano, Gustavo F. Wandalsen et al. Marcadores inflamatórios no monitoramento do controle da asma: revisão. *Revista brasileira alergia imunopatologia*. 2011; 34(5): 193-202.
72. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma and normal subjects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997; 155(2):449-53.
73. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*. 2001; 34: 50-9.

74. Rufino R, Costa CH, Souza HS, Madi K, Silva JR. Perfil celular do escarro induzido e sangue periférico na doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007; 33:510-8.
75. Costa CH, Rufino R, Lapa e Silva JR. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2009; 55(3): 347-54.
76. Pepys J, Roth A, Carrol KB. Skin and nasal tests and the history in grass pollen allergy. *Clinical & Experimental Allergy*. 1975; 5(4): 431-42.
77. Osterbalee O, Weeke B. A new lancet for Skin prick testing. *Clinical & Experimental Allergy*. 1979; 34: 209-12.
78. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax*. 1997;52(6):498-501.
79. Pizzichini MMM, Popov TA, Efthimiadis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1996; 154:866-9.
80. Hoyert DL, Kung HC, Smith BL: Deaths: preliminary Data for 2003. *Natl Vital Stat Rep*.2005: 53:1.
81. Mannino DM: COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and dis-ease heterogeneity. *Chest*. 2002.121(5):121.
82. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, et al: Chronic obstructive pulmonary dis-ease surveillance-United States, 1971–2000. *MMWR Surveill Summ*. 2002.51:1.
83. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, et al: Gender-related differences in severe, ear-ly-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000. 162:2152.
84. Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, et al: Quantitative relationships between ciga-rette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis*. 1977.115:195.

85. Coultas DB, Mapel D, Gagnon R, et al: The health impact of undiagnosed airflow obstruction in a national sample of United States adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001. 164:372.
86. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax*. 1997;52(6):498-501.
87. Fujimoto K, Kubo K, Yamamoto H, Yamaguchi S, Matzuzawa Y. Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema. *Chest*. 1999; 115:697-702.
88. Kanazawa M. Diseases to differentiate from COPD, with emphasis on bronchial asthma [Article in Japanese]. *Nihon Rinsho*. 2007; 65(4):675-8
89. Miravittles M, Morera J. It's time for an aetiologybased definition of chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2007; 12(3):317-9.
90. Kips JC, Fahy JV, Hargreave FE, Ind PW, in't Veen JC. Methods for sputum induction and analysis of induced sputum: a method for assessing airway inflammation in asthma. *European respiratory journal*. 1998; 26:9-12.
91. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1996;153:530–534.
92. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers: regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1355–1360.
93. Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J* 1996;9:1989–1994.

94. Donaldson GC, Wilkinson TM, Hurst JR, Perera WR, Wedzicha JA. Exacerbations and time spent outdoors in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005 1;171(5):446-52.

XIII. Anexos

XIII. 1. Artigo

XIII. 2. Normas de publicação da revista (*European Respiratory Journal*).

XIII. 3. Termo de consentimento livre e esclarecido.

XIII. 4. Ficha de avaliação clínica dos pacientes.

XIII. 5. Ficha de avaliação celular do escarro induzido.

XIII. 6. Ficha de avaliação do *PRICK-TEST*.

XIII. 7. Parecer do comitê de ética CEP\C-HUPES.

XIII.1. Artigo

Characterization of the Inflammatory Profile in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and its Relationship with FEV₁ Reversibility

Cleriston F. Queiroz¹; Antônio Carlos M. Lemos¹; Maria de Lourdes Bastos^{1,2}; Margarida C.L. Costa Neves¹; Natália Carvalho^{1,2}; Edgar M. Carvalho^{2,3}.

¹ Departamento de Pneumologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES), Salvador, Bahia, Brazil.

² Serviço de Imunologia do COM-HUPES, Salvador, Bahia, Brazil.

³ Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Fiocruz), Salvador, Bahia, Brazil

Article for submitted to the journal European Respiratory Journal (ERJ) - 2013 impact factor 7.125 - is the official journal of the European Respiratory Society (ERS) electronically through website: ScholarOne Manuscripts. The norms of publication and letter to the editor in Annex chapter.

Abstract

Objective: To determine if there is a relationship between the cellularity in the sputum and atopy, asthma and severity of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods:** This is a cross-sectional study with 37 patients. The cellularity in the sputum was determined by microscopy after citocentrifugation, Prick tests were performed and serum cytokines were determined by ELISA. **Results:** In 24 patients (group 1) there was no significant change after bronchodilator on the forced expiratory volume (FEV₁) in one second and 13 patients (group 2) had a mean $\geq 12\%$ reversibility of FEV₁. The percentage of eosinophils in the sputum was higher in group 2 than in group 1 ($P < 0.05$) and there was an inverse correlation between the frequency of eosinophils and the FEV₁ ($P < 0.05$). However there were no history of asthma in both groups and no difference was observed in the Prick test. Neutrophils were the predominant cell in both groups. TNF, IL-6, IL-8 and CCL-5 were higher in COPD than in healthy subjects ($P < 0.001$) but did not differ between the groups. **Conclusions:** DPOC patients with reversibility of the FEV₁ after bronchodilator had more eosinophils in the sputum and more airway overreactivity. However this picture was not related to atopy and the cytokine profile was similar in both groups.

Keywords: COPD, inflammation, eosinophil, neutrophil, cytokine.

1. Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is an inflammatory disorder of the airways, parenchyma, and pulmonary vessels, progressing slowly, to irreversible airway obstruction. Studies have shown that during COPD exacerbations there is an increasing in neutrophils and eosinophils, but COPD is typically a neutrophilic inflammation¹. However even in the stable phase, eosinophils can be found in up to 40% of patients², and it has been thought that this feature is related to a subtype of COPD with asthma also known as overlap syndrome ². Moreover in these patients there is a reversibility of the FEV1 after bronchodilator.

The inflammatory response of the airways has received special attention in recent years ³. In addition to a variety of cells, inflammatory mediators such as C-reactive protein (CRP), interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), TNF, and RANTES have been found enhanced in COPD ^{4, 5, 6}. Furthermore, neutrophils, IL-8 and eosinophil cationic protein are higher in smokers with COPD ⁷. According Lapperde et al (2006)⁸, it is possible that inflammation associated with smoking has two stages: an initial phase, with the presence of neutrophils and macrophages in the epithelium and submucosa, and a late stage, with the additional participation of lymphocytes and eosinophils. Nevertheless the association between this subtype of COPD with asthma has been argued, and

the influence of eosinophil in the inflammatory process and severity of COPD it is not completely understood.

The severity of airflow obstruction can be determined by the magnitude of the decrease in FEV₁ and the stages of COPD are based on post-bronchodilator FEV₁ level⁹. Once the diagnosis of COPD is made, pulmonary function test is useful to quantitatively monitor the course of the disease. To determine the severity of COPD, FEV₁ and an assessment of reversibility is reconciled with the Global Initiative for Chronic Lung Disease (GOLD) classification¹⁰. The aim of this study was to determine if there was a relationship between COPD with FEV₁ reversibility with asthma, atopy and severity of COPD. Moreover we evaluated the relationship between frequency of eosinophils and serum cytokines levels with types of COPD based on reversibility of FEV₁.

2. Methods

Study Population

Participants of this cross-sectional study include 37 patients, with diagnosis of COPD according to the GOLD, 2010. All patients were from the Pulmonology Division of the Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos – COM-HUPES, in Salvador, Northeastern Brazil. The study was approved by the Ethic Committee of the COM-HUPES and all patients signed an informed consent. Questionnaires were applied and physical examinations were performed in the participants. Moreover, they underwent pulmonary function tests with emphasis on functional parameters from forced expiratory volume in one second (FEV_1), forced vital capacity (FVC) and relationship (FEV_1 / FVC) $<70\%$ predicted according to GOLD, 2010. Spontaneous or induced sputum was obtained, Prick test to allergens was performed and 10 ml of blood were collected for determination of serum cytokines levels. Healthy subjects (N = 22) were used as controls.

Case Definition

Based on the pulmonary function test parameters established on the GOLD, 2010, and in the response to bronchodilator (COPD) patients were classified in two groups: Group 1 - COPD patients (N = 24) who had no reversibility after bronchodilator and group 2 COPD patients (N = 13) who had

reversibility of FEV1 \geq 12% after bronchodilator. The control group was composed of (N = 22) healthy subjects without COPD and with normal lung function.

Examinations, equipment and protocols

•**Pulmonary function test (spirometry):** All patients underwent spirometry according to the guidelines of the Brazilian Society of Thoracic and normality Spirometry was performed with a bronchodilator salbutamol sulfate 100mcg / ml, Aerolin Spray® (GlaxoSmithKline). Briefly 04 jets (400mcg / ml) with the aid of the spacer (Fumax®) were administered after the 1st step. After waiting 15 minutes the patients returned for for new evaluation after bronchodilator .

•**PRICK TEST:** Patients were submitted to the immediate skin test or SKIN PRICK TEST reading, according to the technique described by Pepys J, 1975¹¹ and modified by Osterbalee & Weeke, 1979¹² to allergens such as dog epithelium, cat epithelium, fungi from the air (*Aspergillus fumigatus*), cockroaches (German Blatela, *Periplaneta americana*) and the mite fauna (*D. pteronyssinus* and *Blomia tropicallis*) using reagents from Immunotech, FDA Allergenic, Rio de Janeiro, Brazil.

- **Technique of induced sputum (IS):** The sputum induction was performed according to the modified protocol described by Pavord et al, 1997¹³ with inhalation of hypertonic saline solution (3, 4 and 5%) in Fisoneb® ultrasonic nebulizer (Canadian Medical Products, Ltd, Markham, Ontario) Low flow rate 0.87ml / min.
- **Determination of serum cytokines and chemokines:** Peripheral blood (10ml) was centrifuged (2.000g) for 10 minutes, and serum was collected and stored in a freezer at - 20 ° C until cytokine measurements. Cytokines and chemokines were measured by sandwich ELISA according to the manufacturer's protocol (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). To quantify TNF and IL-6 high sensitivity kits (HS ELISA Quantikine) were used. For dosage CCL-5 (RANTES) and IL-8 DuoSet ELISA kits were used.

Statistical analysis

Measures of central tendency were used: mean and median for demographic and clinical variables. Data were analyzed using SPSS 17.0 for Windows program. Continuous variables with non-normal distribution were analyzed with the nonparametric Mann-Whitney Test. The comparison of cytokine production between groups 1, group 2 and control group, and the sputum cellularity and severity of DPOC was analyzed by the Kruskal Wallis Test. The relationship between cytokine and chemokine levels and severity of

DPOC and body mass index (BMI) was determined by the Spearman correlation.

4. Results

Characteristics of the sample

Some demographic features, the frequency of smokers and the results of the pulmonary function in COPD patients with or without reversibility of the FEV₁ after use of bronchodilator are shown on Table 1. There were no differences among the groups regarding age, gender, percentage of smokers or former smokers. There was also no difference in the BMI and in the oxygen saturation (SPO₂) in the two groups. The severity of the COPD was assessed by pulmonary function test. All patients in the sample had a relationship (FEV₁ / FVC %) \leq 70% predicted. The FEV₁ before / after bronchodilator in group 1 was 48.2 (30-66) \ 51(35-71), while in the group 2 it was 35(28-44) \ 47 (36-52) (p<0.03).

Evaluation of severity of the DPOC sputum cellularity, and assessment of atopy in the 2 groups of COPD patients.

The severity of COPD was determined according to the guidelines of the GOLD 2010. While patients in the group 1 were distributed in the stage II, III and IV of COPD in group 2 the majority of the patients 12 (92,3%) were in stage III. While neutrophils increased with severity of COPD with higher num-

ber of these cells in the stage III, eosinophils were not detected in patients with stage IV of COPD (Data not shown).

In both groups the differential counts of neutrophils and eosinophils in the sputum smear was performed. The number of neutrophils did not differ between the two groups ($p>0.05$). However, eosinophil count was higher ($p<0.05$) in group 2 compared to group 1. The total count of cells in sputum induced group 1 showed a higher average in relation to group 2, although there was no statistical difference ($p<0.11$).

The evaluation of atopy through Prick test did not show difference between groups by positivity to any of the antigens. Five patients (21%) in the group 1 had at least one positive test and four patients (31%) in group 2 ($p>0.05$). Moreover none of the patients in group 1 and 2 had history of asthma.

Percentage of neutrophils and eosinophils in the sputum according the severity of the DPOC and relationship between frequency of eosinophils and FEV1.

The relationship between the frequency of eosinophils in the sputum and FEV1 before and after BD are shown on figure 1. There was an inverse relationship between the frequency of eosinophils in the sputum and FEV1 before and after BD.

Comparison of serum levels of cytokines (TNF and IL-6) and chemokines (IL-8 and CCL-5) in the different groups.

The cytokine and chemokine levels in the two types of DPOC and in control group are on figure 2. TNF levels in group 1, 2.9 (0.95 – 6.03 pg / ml) and group 2, 3.2 (2.65 - 5.50 pg/ml) were higher ($p < 0.01$) than in controls 0.35 (0 - 1.9 pg / ml). The IL-6 levels were also higher in group 1, 1.4 (0.42 – 2.10 pg / ml) and group 2, 0.92 (0.37 - 1.89 pg/ml) ($p < 0.01$) than in controls (0 - 0 pg / ml). The IL-8 levels were higher ($p < 0.05$) in group 1 than in HC and there was no difference ($p > 0.05$) in CCL5 levels between the COPD groups and between COPD and HC. The median values were 0 (0 - 51.75); 0 (0 - 57.50) and 0 (0-0) for the 2 groups and controls respectively with statistical difference between group 1 and controls ($p < 0.05$) (Figure 1c). There was no difference in serum levels of the chemokine CCL-5, between the three groups (Figure 1d). There was no significant correlation between TNF- α , IL-6, IL-8 and CCL5 with severity of COPD (data not shown).

Correlation between TNF, serum levels and the BMI.

The correlations between the TNF serum levels and BMI of the patients in group 1 and 2 are shown on figure 3. There was an inverse correlation between TNF and BMI in both groups (Figure 3 a, b).

5-Discussion

COPD is the 4th place among the leading causes of death in the United States.¹⁴ Both prevalence and mortality associated with COPD continue to rise. Additionally, COPD has become a major cause of death and disability globally¹⁵. COPD is a severe progressive inflammatory disease and recently two subtypes of the disease have been identified based on the reversibility of the FEV1. Herein we evaluate the relationship between these subtypes with the cellularity in the sputum, severity of COPD and cytokine level. COPD patients with reversibility of FEV1 had more eosinophils in the sputum, more airway overactivity and there was an inverse correlation between eosinophils in the sputum and the FEV1 in both before and after BD. Furthermore we showed that COPD with reversibility of the FEV1 was not associated with atopy or asthma. Indeed we extend previous observations showing that while IL-6, IL-8 and TNF were higher in COPD patients than in healthy subjects but the production of these cytokines were similar in the two types of COPD.

Historically, the incidence of COPD is higher among men and smokers. However the frequency of women is increasing¹⁶. Moreover among patients with early onset of severe COPD a marked female predominance has been reported¹⁷. In our study the frequency of males and females as well of smo-

kers were similar in the two groups of COPD.

The analysis of sputum is an useful tool in the evaluation of inflammation of the air way ¹³. Induced sputum (IS) was initially used for the diagnosis of lung cancer and later for infectious diseases. In the early 1990s this method was employed in the investigation of bronchial inflammation associated with asthma ¹⁸. More recently it has been used for investigation of the pathogenesis of asthma and COPD due to its safety, reproducibility and low cost. Neutrophil local inflammation is a hallmark of COPD along with the increasing of inflammatory mediators in the airways as well as in circulating blood ¹⁹. The neutrophilic inflammation with release of neutrophil elastase, acid phosphatase and mieloperoxidase are characteristics of COPD ^{20, 21, 22}. Neutrophils are the predominant cells in the sputum of COPD patients and high percentage of these cells were found in both group of the present study ³. It is possible that the rapid migration of these cells make it easier to find them within the airways than in bronchial wall or lung parenchyma. However the hypertonic saline solution used for the induced sputum techniques may contribute for the increased number of neutrophils ²³.

The role of eosinophils in the sputum of COPD patients is not clear. Initially it was thought that the presence of eosinophils was related to a subgroup of COPD patients with features of asthmatic disease ² and the presence of eosinophils in the sputum of COPD patients was also associated

with a better response to corticosteroids therapy ²⁴. Actually the association between asthma and COPD would help in developing strategies for the therapeutic management of COPD ^{25, 26}. However our data argue against the occurrence of asthma in patients who had reversibility of the VEF1 with bronchodilator. First none of the patients had previous history or had family history of asthma and the prevalence of atopy based on the PRICK-TEST was similar in the two groups of COPD. Moreover the immunologic profile regarding cytokine and chemokine production was similar in both groups and there was no increasing in CCL5 a typical Th2 cytokine in COPD patients with reversibility of the FEV1 for BD. Although we have previously found an association of nasal eosinophil with atopy in patients with COPD ²⁷ herein there was no association between eosinophils in the sputum and atopy or asthma. While the role of eosinophils in COPD is not completely understood our observation that eosinophil was increased in patients with COPD who had reversibility with bronchodilator, that this group had lower FEV1 and that there was an inverse correlation between frequency of eosinophils in the sputum and decrease in the FEV1 pointed out that this patients have more bronchial overactivity. In such case one may expect that eosinophils are related to the severity of COPD but eosinophils were not found in patients in the stage IV of COPD.

Increased levels of IL-6, IL-1 β , TNF- α and IL-8 have been observed in induced sputum from patients with stable COPD⁴. There are also evidences of the relationship between enhancements of cytokines in COPD with cigarette smoke^{5, 28}. However the relationship of these chemokines with eosinophil in the sputum or with FEV1 reversibility have not been evaluated. The serum IL-6 is considered the best biomarker of COPD severity when associated with levels of airway obstruction and is associated with mortality⁶. We have not found association between serum levels of IL-6, IL-8, TNF and CCL5 with severity of COPD. Relevant was the documentation of an inverse correlation between TNF serum levels and BMI. In this study it was possible to evaluate the levels of cytokine IL-6, TNF- α , and chemokines IL-8 and RANTES/CCL-5 in COPD with who had or not FEV1 reversibility after BD. However the cytokine and chemokine levels were similar in the two groups of COPD patients. This data confirmed previous observation of the increase correlation between TNF and BMI.

One limitation of the present study is the small number of participants. However, the differences between the COPD severity in both groups was significant indicating that group 2 was more obstructive. Nevertheless the observation that COPD with reversibility of the FEV1 is not related to asthma, but with increasing in eosinophils in the sputum, and that there is an inverse

correlation between the frequency of eosinophils in the sputum and FEV1 indicate that eosinophils may play an important role in the inflammatory response in a COPD patients with reversibility of the FEV1 post bronchodilator.

7. Acknowledgement

We acknowledge the contribution of Fabiola Jesus Ramos with the database and Cristiano Franco for secretarial assistance.

8. References

1. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, et al. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1994; 150(6 Pt 1):1646-52.
2. Brightling CE, Monteiro W, Ward R, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, et al. Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Lancet*. 2000;356:1480-5.
3. Rufino R, Costa CH, Souza HSP, Madi K, Lapa e Silva JR. Perfil celular do escarro induzido e sangue periférico na doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007; 33(5): 510-518.
4. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1996;153:530–534.
5. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers: regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 ;162:1355–1360.
6. Celli BR, Locantore N, Yates J, Tal-Singer R, Miller BE, Bakke P et al. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2012; 185(10):1065-72.
7. Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *European Respiratory Journal*. 2005 ;26(5):835-45.

8. Lapperre TS , Postma DS, Gosman MM, Snoeck-Stroband JB, ten Hacken NH, Hiemstra PS, et al. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax*. 2006; 61(2):115-21.
9. Hurd S: The impact of COPD on lung health worldwide: epidemiology and incidence. *Chest*. , 2000.117(2):1S.
10. Senior RM, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease. *ACP Medicine*. 2007; 1-18.
11. Pepys J, Roth A, Carrol KB. Skin and nasal tests and the history in grass pollen allergy. *Clinical & Experimental Allergy*. 1975; 5(4): 431-42.
12. Osterbalee O, Weeke B. A new lancet for Skin prick testing. *Clinical & Experimental Allergy*. 1979; 34: 209-12.
13. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax*. 1997;52(6):498-501.
14. Hoyert DL, Kung HC, Smith BL: Deaths: preliminary Data for 2003. *Natl Vital Stat Rep*.2005: 53:1. Mannino DM: COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest*. 2002.121(5):121.
15. Mannino DM: COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest*. 2002.121(5):121.
16. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, et al: Chronic obstructive pulmonary disease surveillance-United States, 1971–2000. *MMWR Surveill Summ*. 2002.51:1.
17. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, et al: Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000. 162:2152.

- 18.** Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992; 47(1): 25-9.
- 19.** Moermans C, Heinen V, Nguyen M, Henket M, Sele J, Manise M, Corhay JL, Louis R. Local and systemic cellular inflammation and cytokine release in chronic obstructive pulmonary disease. *Cytokine*. 2011; 56(2): 298-304.
- 20.** Saetta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999; 160(5 Pt 2):17-20.
- 21.** Cosio MG, Majo J, Cosio MG. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest*. 2002; 121(5):160-165.
- 22.** Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, Saetta M. *Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006; 174(1):6-14.
- 23.** Kips JC, Fahy JV, Hargreave FE, Ind PW, in't Veen JC. Methods for sputum induction and analysis of induced sputum: a method for assessing airway inflammation in asthma. *European respiratory journal*. 1998; 26:9-12.
- 24.** Fujimoto K, Kubo K, Yamamoto H, Yamaguchi S, Matzuzawa Y. Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema. *Chest*. 1999; 115:697-702.
- 25.** Kanazawa M. Diseases to differentiate from COPD, with emphasis on bronchial asthma [Article in Japanese]. *Nihon Rinsho*. 2007; 65(4):675-81.
- 26.** Miravittles M, Morera J. It's time for an aetiologybased definition of chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2007; 12(3):317-9.

27. Neves Margarida Celia Lima Costa, Neves Yuri Costa Sarno, Mendes Carlos Mauricio Cardeal, Bastos Monalisa Nobre, Camelier Aquiles Assunção, Queiroz Cleriston Farias et al. Avaliação de atopia em portadores de DPOC. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2013; 39(3): 296-305.
28. Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J* 1996;9: 1989–1994.

9. Tables and Graphics

Table 1- Demographic, clinical and pulmonary function test features in patients with COPD

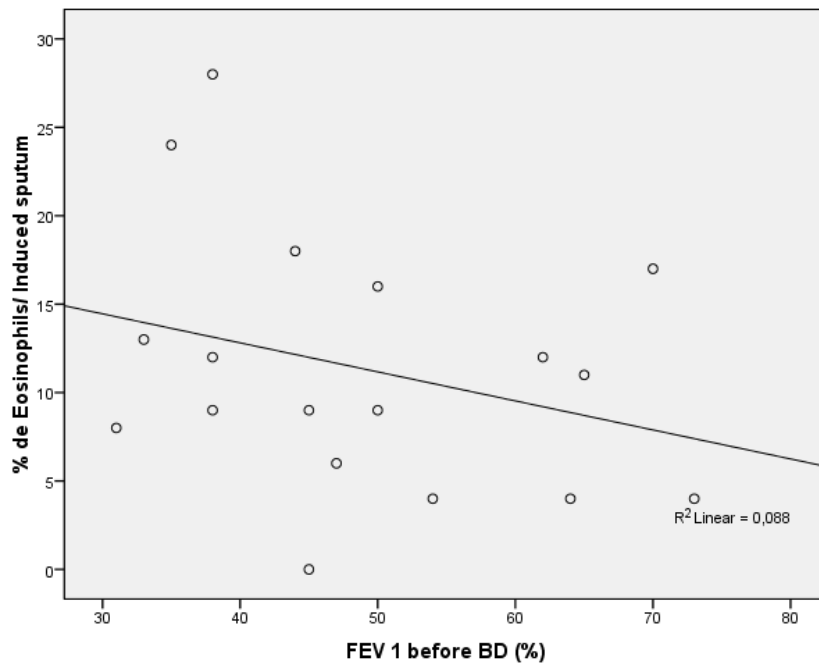
Variáveis n(%)	Group 1 n=24	Group 2 n=13	p
Gender M\F	11\11	6\7	0,72
Age*(years)	66 (57-73)	69(59-76)	0,88
Smoking	8(27,3)	4(30,8)	0,67
Former Smokers	16(72,7)	9(69,2)	0,43
BMI *	22(19-25)	18(18-21)	0,11
SPO ₂ *	96(94-97)	95(93-97)	0,93
Onset of symptoms*	54(42-58)	55(43-56)	0,97
FEV ₁ \FVC pre /post*	64(53-70)/66 (51-62)	59(53-69)/62(57-68)	0,56
FEV ₁ pre/post*	48(30-66) /51(35-71)	35(28-42)/ 40(35-50)	0,03
FVC * pre /post*	69 (57-84) /76(64- 89)	58(53-66)/69 (59-77)	0,12

* Values expressed as median (interquartile range); M: male F: female; COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease; SpO₂: peripheral oxygen saturation; FEV₁: forced expiratory volume in 1 second, FVC: forced vital capacity; relationship FEV₁ \ FVC; pre / post: before and after bronchodilators, for p <0.01 was used the Mann-Whitney test Sig. (2 -tailed).

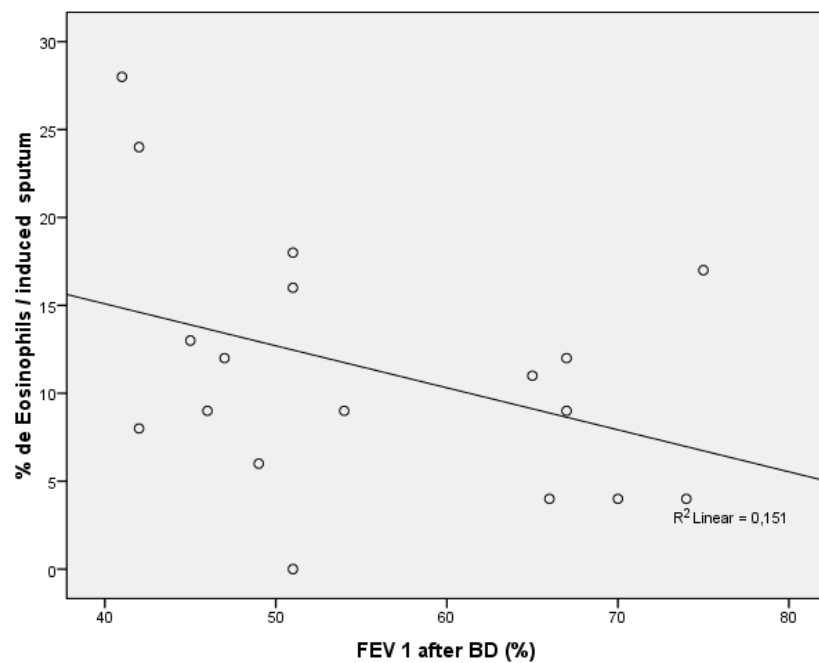
Table 2- Absolute values of cell counts in induced sputum of COPD stages and results of allergy testing in patients with COPD.

Variables	Group 1	Group 2	p
n(%)	n=24	n =13	
Total cells x (10 ⁶ /ml)*	834.441	200.504	0,11
Neutrophils*	36,95±15,83	38,77± 16,16	0,67
Eosinophils*	4,45±7,63	9,46±7,42	0,05
Stage II (GOLD)	6(27,3)	0	0,03
Stage III (GOLD)	12(45,5)	12(92,3)	0,77
Stage IV (GOLD)	6(27,3)	1(7,7)	0,43
PRICK –TEST (+)	5(20,8)	4(30,8)	0,58
PRICK- TEST (-)	17(70,8)	9(69,2)	0,09

* Values expressed mean ± standard deviation; Prick-test (+): positive skin test; Prick-test (-): negative test; COPD: Chronic Obstructive Lung Disease; II- stage two; III: stage three; IV: stage four; GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; p-value was used the Mann-Whitney Test Sig. (2 -tailed)

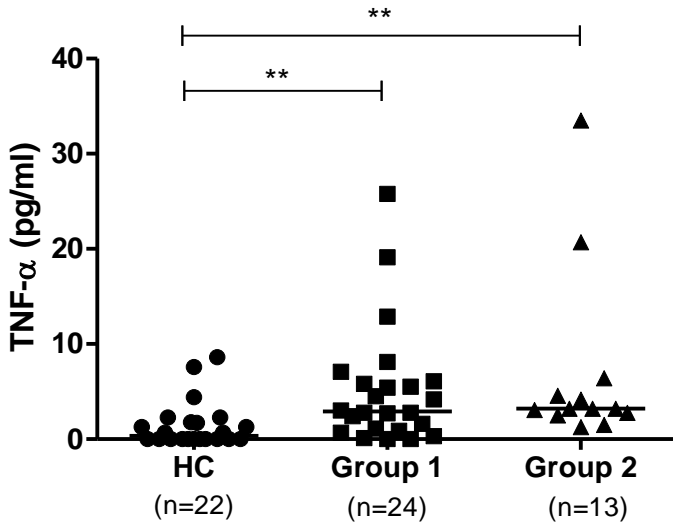


a)

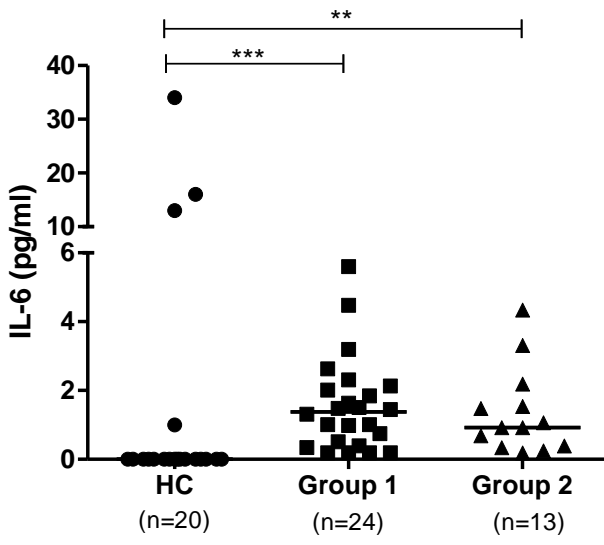


b)*

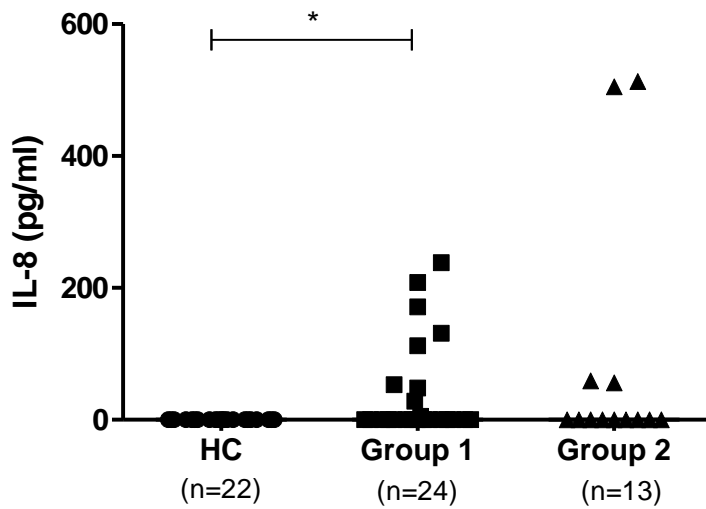
Figure 1 (a, b) - Percentage of sputum eosinophils and values of before and after bronchodilator (BD) FEV₁, including group 1 and group 2. The evaluation results are shown in the Simple Scatter. Used test statistic Correlation Coefficient Spearman $p < 0.01$ (signal 2-tailed).



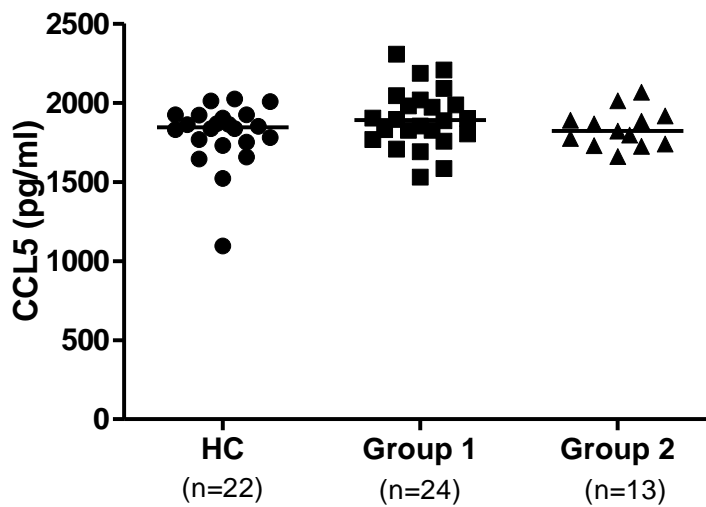
a)



b)

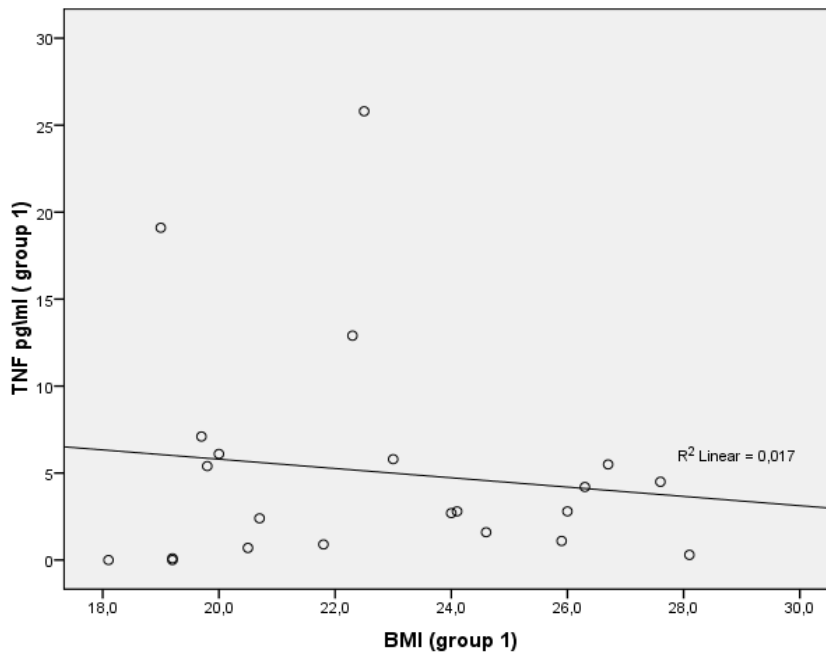


c)

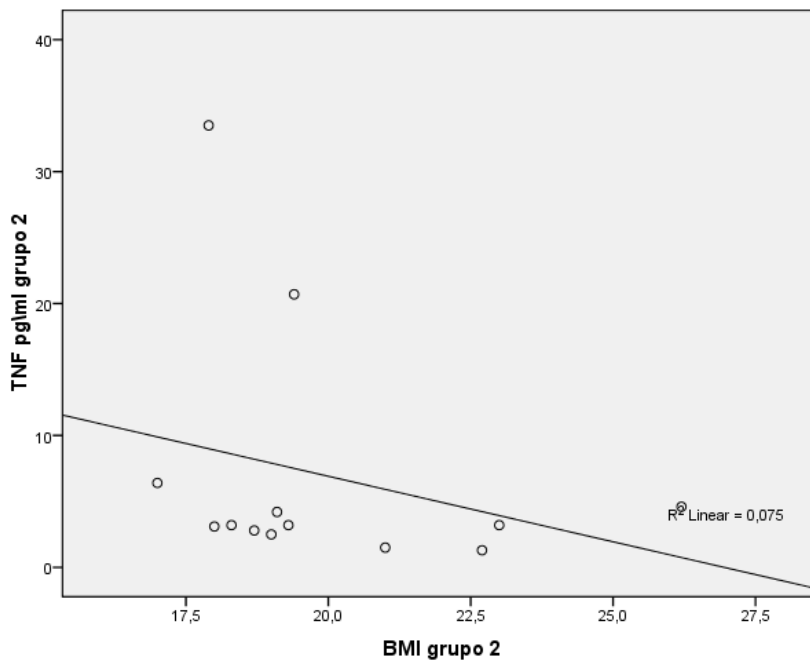


d)

Figure 2 (a, b c, d) - Serum levels of cytokines (pg / ml) TNF- α , IL-6, IL-8 and CCL-5/RANTES in patients with COPD, group 1, 2 and healthy control individuals (HC). The results are shown in dot-plot. The Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test Multiple Comparison Test were used for the statistical analysis * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.



a)



b)*

Figure 3 (a, b) - Relationship between serum TNF level and BMI values in group 1, group 2. The results are shown in Simple Scatter. Used test statistic Correlation Coefficient Spearman Sig (2 –tailed). * $p < 0.01$.

XIII. 2. Normas de publicação da revista

European Respiratory Journal Information for Authors

The *European Respiratory Journal*, the official journal of the European Respiratory Society, publishes 12 issues in two volumes per year in English.

The *ERJ* publishes clinical and experimental work relating to all aspects of respiratory medicine, including cell biology, epidemiology, immunology, pathophysiology, thoracic imaging, paediatric pneumology, occupational medicine, intensive care, sleep medicine, thoracic surgery and thoracic oncology. In addition to such original material, the *ERJ* prints editorials, reviews, series articles, correspondence and letters to the editor.

The *ERJ* takes part in the HINARI Programme. The HINARI Programme, set up by the World Health Organization together with major publishers, enables developing countries to gain access to collections of biomedical and health literature. Over 6400 journal titles are now available to health institutions in 108 countries, areas and territories, benefiting many thousands of health workers and researchers, in turn contributing to improved world health. For more information about HINARI, go to www.who.int/hinari/en/

All submissions to the *ERJ* are handled *via* the [ScholarOne Manuscripts](#) platform, which provides detailed instructions of how to follow the submission process. If you experience problems or require any further assistance, please contact the submission helpline direct on +44 114 2672864 or contact [Gill Archer](#), ScholarOne Manuscripts coordinator.

Manuscript preparation

Presentation of manuscripts should be consistent with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, as recommended by the International Committee of Medical Journal Editors ([ICMJE](#)).

All manuscripts must be submitted electronically using the online submission at [ScholarOne Manuscripts](#). Detailed instructions of how to submit are available on the website itself and the process is self explanatory. However, if you do experience problems, please contact the submission helpline direct on +44 114 2672864 or contact [Gill Archer](#), ScholarOne Manuscripts coordinator.

European Respiratory Journal manuscripts should be prepared in accordance with the [manuscript preparation guidelines](#) for ERS research publications. These cover manuscript content as well as ethical, authorship and conflict of interest considerations.

Before entering the *ERJ* ScholarOne online submission area, please read and carefully follow the [manuscript preparation guidelines](#) and the information below.

Brief requirements for articles are summarised in the following table. Further details can be found in the [manuscript preparation guidelines](#).

Article type	Word limit	Figures and tables	References	Online supplement	Abstract
Original research	3000	8	40	Accepted	Yes, 200 words
Editorials	1500	2	30	Not accepted	No
Review and series articles	5000	5	200	Accepted	Yes, 200 words
Research letters	1200	1	15	Not accepted	No
Correspondence	800	1	10	Not accepted	No
Task force reports, guidelines and consensus statements	8000	15	250	Accepted	Yes, 200 words

The number of figures and tables in the above summary refers to the total number of both; for example, letters can have either one figure or one table, not one of each.

Peer review

On submission of your manuscript, you will be notified by e-mail on receipt of the submitted online draft and provided with a manuscript number for future reference.

Each manuscript will be reviewed by the chief editor and associate editors. Because the *European Respiratory Journal* receives many times more submissions than it can publish, manuscripts that are not regarded as sufficiently original or high in priority may be rejected after review by the editors. We will aim to communicate such a decision to you quickly so you can consider other publication routes for your work.

Manuscripts not rejected at this stage will be subjected to peer review by external reviewers and statistical advisors. After your manuscript has been reviewed, you may be requested to make changes to your manuscript arising from reviewer comments. When submitting your revised manuscript, two copies must be provided: one clean copy of the revised manuscript, and one copy in which all of the text added as a result of reviewer comments is highlighted in red.

The reviewers and associate editors will recommend their decisions to the chief editor, who will then be responsible for the final decision to accept or reject a manuscript.

If your manuscript is rejected after peer review, and you wish to appeal the decision, please e-mail a letter of rebuttal to: erj.chief-editors@ersnet.org

In the appeal letter, you should clearly state your name, the title of your manuscript and the manuscript number. Furthermore, it will help us to handle your appeal if you can provide specific point-by-point

responses to any comments made by the editors and reviewers in support of their original decision. We will respond to all appeals as soon as possible, but of course in some cases it may take some time to make a final decision. The decision of the chief editor is final and only one appeal will be considered per manuscript.

Copyright

Submission of the manuscript implies that if and when it is accepted for publication, the authors automatically agree to transfer the copyright to the publisher. The copyright transfer implies that the publisher holds the exclusive right to reproduction in any form (including publication in another language) and distribution of any of the articles in the journal. Material published in the *European Respiratory Journal* may not be stored in any electronic format, or be reproduced photographically, except with the prior written permission of the publisher.

One copyright form should be completed by the corresponding author on submission of any manuscript to the *ERJ*, and by all authors when a paper is accepted.

[Link to form](#)

Further to the transfer of publishing rights to the ERS, authors can opt to make their article open access through the ERJ Open scheme, and are permitted to self-archive their manuscripts after the journal's embargo period has elapsed.

Full details regarding open access, public archiving and funder mandates can be found in the following section.

Open Access

What is ERJ Open?

ERJ Open is an optional service offered by the European Respiratory Society that enables authors to ensure that their final published contribution is made available for anyone to access online, immediately on publication. This option is an important part of our response to the changing expectations of customers and funding bodies who support research and scholarly communication.

Costs

There is a flat fee of £2000. Payment in GBP is preferred, although other currencies may be permissible subject to contacting our accounts department. The article charge does not cover any extra costs associated with publication, *e.g.* colour charges, about which you would be notified if your article is selected for publication. You will be required to complete and submit an Article Charge Form ([link to form](#)). As the author (or nominated corresponding author), you are responsible for the payment of this fee. Pre-payment in full is required to activate ERJ Open. If the ERS does not receive payment of the fee, the article will not be published open access.

What happens to an open access paper?

You should submit your paper according to the journal's instructions for authors and guidance on preparation of manuscripts. Only after your paper is accepted for publication will you be able to request

that your paper is published open access; your choice to pay for this open access service will not affect the peer-review process, and payment of an open access fee will not secure preferential treatment.

ERJ Open is available immediately upon online publication (*i.e.* in ERJ In Press if your article meets the criteria for inclusion in the In Press section) through to final publication (in a print and online monthly issue). All ERJ Open articles will be identified by means of an icon in the table of contents and search results.

In addition, ERJ Open articles will carry the following notice:

©ERS 20XX ERJ Open articles are open access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial Licence 4.0.

The ERS as the publisher will deposit the full text of your article in PubMed Central (PMC) upon final publication.

At this time, the ERS does not allow articles that have already been published to be made open access.

Terms and conditions for ERJ Open papers

It is ERS policy to require copyright assignment for all *European Respiratory Journal* articles to enable efficient handling of rights, to safeguard authors against plagiarism and infringement and to protect and authenticate the final published version. For more details, please refer to our copyright form.

ERJ Open articles are protected by copyright. Publishing an ERJ Open paper enables legitimate open distribution of your work online under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial Licence 3.0 (creativecommons.org), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided it is for non-commercial purposes, and that the original work is properly cited. If a paper is not reproduced in its entirety but only in part, or as a derivative work, this must be clearly stated.

Use of ERJ Open articles for commercial, promotional or marketing purposes requires further explicit permission from ERS (permissions@ersj.org.uk) and may be subject to a fee. Commercial purposes include:

copying or downloading articles, for further redistribution, sale or licensing;

copying, downloading or posting by a site or service that incorporates advertising with such content;

the inclusion or incorporation of article content in other works or services that are then available for sale or licensing, for a fee;

use of article content by for-profit organisations for promotional purposes;

use for the purposes of monetary reward by means of sale, resale, licence, loan, transfer or other form of commercial exploitation such as marketing products.

Print reprints and eprints of ERJ Open articles can be purchased from permissions@ersj.org.uk

“Green” open access and author archiving

Authors who do not wish to pay for the ERJ Open option will still have their manuscripts made free to access via the ERJ online archive following the journal's 18-month embargo period; after this embargo period, authors also have licence to deposit their manuscripts in an institutional (or other) repository for public archiving, provided the following requirements are met:

- 1) The final, peer-reviewed, author-submitted version that was accepted for publication is used (before copy-editing and publication).
- 2) A permanent link is provided to the version of the article published in the ERJ, through the dx.doi.org platform. For example, if your manuscript has the DOI 10.1183/09031936.00123412, then the link you provide must be dx.doi.org/10.1183/09031936.00123412
- 3) The repository on which the manuscript is deposited is not used for systematic distribution or commercial sales purposes.
- 4) The following required archiving statement appears on the title page of the archived manuscript: "This is an author-submitted, peer-reviewed version of a manuscript that has been accepted for publication in the European Respiratory Journal, prior to copy-editing, formatting and typesetting. This version of the manuscript may not be duplicated or reproduced without prior permission from the copyright owner, the European Respiratory Society. The publisher is not responsible or liable for any errors or omissions in this version of the manuscript or in any version derived from it by any other parties. The final, copy-edited, published article, which is the version of record, is available without a subscription 18 months after the date of issue publication."

Manuscripts funded by NIH or Europe PubMed Central Funders Group members

The *European Respiratory Journal* now has in place an author-pays open access scheme, ERJ Open (see above). For authors of manuscripts funded by NIH or Europe PubMed Central Funders Group members who do not wish to take up this option, the following allowances apply.

For manuscripts with NIH funding, the journal acknowledges that the author retains the right to provide a copy of the final, peer-reviewed author-supplied manuscript (before copy-editing and publication) to the NIH upon acceptance for journal publication, for public archiving in PubMed Central 12 months after publication in a journal issue.

If any of the authors of a manuscript have been supported by the Wellcome Trust or other member of the Europe PubMed Central Funders Group, the journal acknowledges that the author retains the right to provide a copy of the final, peer-reviewed author-supplied manuscript for public archiving on PubMed Central in compliance with requirements.

Other funder mandates

If your research body mandates an access or archiving model that is not addressed above, please contact info@ersj.org.uk

ERJ In Press

Unless requested otherwise, original articles, reviews, series articles and research letters accepted for publication will be published online before they appear in a printed issue of the *European Respiratory*

Journal. Proofs posted online as *ERJ* In Press articles may be subject to minor changes before final publication in a print issue of the journal.

CME

Accepted manuscripts deemed to be of educational value are submitted to EBAP (the European Board for Accreditation in Pneumology) for accreditation as Continuing Medical Education (CME) articles. *European Respiratory Journal* readers then have the chance to earn CME credits by reading such articles and correctly answering a selection of multiple choice questions about the manuscript in question.

If your article is deemed to be of educational value, upon acceptance for publication, you may be asked to provide four to six multiple-choice questions to be published with the article. Prompt composition of such questions will enable the timely publication of the article and the *ERJ*.

From January 1, 2010, CME credits will be free of charge. For more information, visit dev.ersnet.org/900-cme-credits.htm.

XIII. 3. Termo de consentimento livre e esclarecido

Caracterização do perfil inflamatório em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e sua relação com a gravidade e reversibilidade do VEF₁

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ fui informado de que este estudo é uma pesquisa e que o objetivo é a avaliação da minha falta de ar (DPOC) através da técnica do escarro em pacientes com a minha doença (DPOC).

A participação neste estudo envolve o preenchimento de um questionário confidencial, a coleta do escarro através da indução com soro ou espontaneamente, bem como a aplicação do teste alérgico, coleta de sangue conforme detalhado abaixo.

A duração prevista da minha participação na pesquisa é de um ano até no máximo dois anos. Os resultados deste estudo não se beneficiarão diretamente, mas poderão ajudar, no futuro, para avaliação de novas estratégias para controle da minha doença (DPOC).

Serão realizados os seguintes procedimentos: primeiramente, serei submetido à aplicação de teste alérgico (*PRICK-TEST*) subcutâneo no antebraço onde será feita a limpeza da pele com álcool etílico e com uma caneta marcará um ponto a cada 1,5cm de intervalo para identificar o local onde deverá ser colocada a gota do extrato alérgico e da solução positiva (histamina) e negativa (salina glicerinada). Com uma agulha curta e fina (tipo para insulina) será feita uma pressão por um segundo na pele onde será colocada a gota do extrato alérgico e a leitura será efetuada 15 a 20 minutos após a realização do teste alérgico cutâneo e também a retirada do excesso de líquido com gaze. Em seguida o caroço (pápula) que se formar deverá ser contornado com uma caneta de ponta fina e aplicada a fita adesiva sobre o desenho da pápula transferindo para minha ficha, este fica sendo o resultado do meu teste alérgico que irei realizar uma única vez durante o estudo. Durante o estudo farei nebulização em nebulizador de jato tradicional com soro (salina hipertônica de NaCl a 3% e 5%) durante 20 minutos sendo 10 minutos para cada soro. Em seguida sou perguntado se há presença de secreção e se é possível de expectoração (escarrar) onde sou levado para local apropriado para realização da manobra, o escarro é coletado em coletor esterilizado que entregarei ao responsável pelo exame. Serão coletados 10 ml de sangue para avaliação. Um

garrote será amarrado ao meu braço para melhor visualização dos vasos sanguíneos e logo após uma agulha será espetada e coletado direto para seringa o meu sangue para amostra.

Desde já consinto a realização de todos os tipos de análises citológicas (celulares) e imunológicas das amostras coletadas.

Os possíveis desconfortos e riscos inerentes aos procedimentos do estudo são aqueles relacionados com a nebulização da solução hipertônica, e aplicação do teste alérgico de leitura imediata. Na nebulização da solução hipertônica poderá ocorrer falta de ar (broncoespasmo), chiado no peito e sibilos (piar) durante a manobra de expectoração (escarrar). O ambulatório de Pneumologia do C-HUPES é equipado com suporte de emergência para reverter quadros de broncoespasmo e chiado no peito como: carrinho emergencial, nebulização com broncodilatadores, bombinhas para falta de ar e profissionais treinados. O teste alérgico por sua vez apresenta risco para pacientes com reações exacerbadas (fortes) para com o extrato alergênico que foi colocado no braço durante o exame como: coceira (prurido intenso) e vermelhidão no local da aplicação.

Os voluntários participarão no início do estudo e, portanto, meu nome não será divulgado em nenhum tipo de publicação no início ou término do estudo.

Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes, quaisquer esclarecimentos sobre os mesmos estarão disponíveis para mim caso eu manifeste o desejo de obtê-los.

Dr _____ discutiu comigo esta informação e se colocou à disposição para responder minhas perguntas eu poderei contactá-lo pelo telefone _____, ou entrar em contato com o responsável pelo estudo.

Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária e não remunerada, e eu sou livre para recusar participar no estudo, ou me retirar em qualquer época após seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que possa necessitar em decorrência dos procedimentos realizados no âmbito do estudo.

Recebi uma cópia deste formulário e tive a oportunidade de lê-lo cuidadosamente, bem como de tirar todas as minhas dúvidas.

Pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

Assinatura:	RGn° _____	Data __/__/__
Testemunha:	RGn° _____	
Função no estudo _____		

XIII.4. Ficha de avaliação clínica dos pacientes

Universidade Federal da Bahia

Hospital Universitário Prof. Edgard Santos

Rua Augusto Viana s/n - Canela - CEP: 40.110-060 - Salvador – BA Tel.: (071) 3283-8000

FAX: (071) 3283-8000 E-mail: hupes@ufba.br

FICHA CLÍNICA

Paciente N°: _____

1- NOME: _____ IDADE _____ (nn)
 2- Nº PRONTUÁRIO: _____ 3- DATA DE NASCIMENTO: _____
 4- ENDEREÇO: _____
 5- TELEFONE _____
 6- OCUPAÇÃO ATUAL: _____ 7- ANTERIOR: _____
 8- Data da consulta: ____/____/____ (nn/nn/xxx)

2- SEXO: (2A) masculino (2B) feminino
 3- RAÇA: (3A) branca (3B) preta (3C) amarela (3D) parda (3E) indígena

4. ESCOLARIDADE:
 (4A) Fundamental
 (4B) Segundo grau
 (4C) Superior
 (4D) Apenas alfabetizado ou nenhum

SINTOMAS E DOENÇAS RESPIRATÓRIAS

5. TOSSE CRÔNICA :

5A. O SR COSTUMA TER TOSSE, SEM ESTAR RESFRIADO(A) ?
 (5A1) Não (5A2) Sim
 5B. HÁ MESES EM QUE A TOSSE OCORRE NA MAIORIA DOS DIAS OU QUASE TODOS OS DIAS?
 (5B1) Não (5B2) Sim
 5C. A TOSSE DURA NO MÍNIMO TRÊS MESES A CADA ANO?
 (5C1) Não (5C2) Sim
 5D. PRESENÇA DE TOSSE POR MAIS DE 02 ANOS?
 (5D1) Não (5D2) Sim

6. CATARRO

6A. O SR GERALMENTE TEM CATARRO, MESMO SEM ESTAR RESFRIADO?
 (6A1) Não (6A2) Sim
 6B. HÁ MESES EM QUE OCORRE CATARRO NA MAIORIA DOS DIAS OU QUASE TODA A SEMANA?
 (6B1) Não (6B2) Sim
 6C. ESTE CATARRO OCORRE NA MAIORIA DOS DIAS, PELO MENOS TRÊS MESES A CADA ANO?
 (6C1) Não (6C2) Sim
 6D. ESTE CATARRO OCORRE MAIS FREQUENTEMENTE H MAIS DE 02 ANOS?
 (6D1) Não (6D2) Sim

7.SIBILÂNCIA

7A. RELATO DE SIBILÂNCIA NO ÚLTIMO ANO ANO?

(7A1) Não (7A2) Sim

7B. NO ÚLTIMO ANO HOUVE SIBILOS, APENAS COM RESFRIADO?

(7B1) Não (7B2) Sim

7C. NO ÚLTIMO ANO HOUVE ALGUMA CRISE MAIOR SE SIBILOS COM FALTA DE AR?

(7C1) Não (7C2) Sim

8. DISPNEIA**8A. REFERE DISPNEIA AO ANDAR RÁPIDO NO PLANO?**

(8A1) Não (8A2) Sim

8B. É PRECISO ANDAR MAIS LENTO QUE PESSOAS DA SUA IDADE, POR DISPNEIA?

(8B1) Não (8B2) Sim

8C. JÁ PAROU DE ANDAR DEVAGAR NO PLANO PARA RESPIRAR?

(8C1) Não (8C2) Sim

8D. PRECISA PARAR DE ANDAR ALGUNS MINUTOS NO PLANO PARA RESPIRAR?

(8D1) Não (8D2) Sim

7E. REFERE DISPNEIA PARA TROCAR DE ROUPA, TOMAR BANHO OU SAIR DE CASA?

(8E1) Não (8E2) Sim

9. DIAGNÓSTICOS PRÉVIOS**9A. REFERE DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE ENFISEMA PULMONAR OU DPOC?**

(9A1) Não (9A2) Sim

9B. REFERE DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE ASMA, BRONQUITE ASMÁTICA OU ALÉRGICA?

(9B1) Não (9B2) Sim

9C. REFERE DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE BRONQUITE CRÔNICA?

(9C1) Não (9C2) Sim

10. SINTOMAS**10A. COM QUE IDADE COMEÇOU A TER DISPNEIA? _____****10B. HÁ RELAÇÃO DE DISPNEIA/TOSSE COM ESFORÇO, POEIRA, MEDICAÇÕES, PÊLO DE ANIMAL, ODORES, MOFO, FRIO, GASES, FUMAÇA, INFECÇÃO, EMOÇÃO OU MUDANÇA DE TEMPO**

(10B1) Não (10B2) Sim

10C. OS PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS ATRAPALHAM AS ATIVIDADES OU FALTA AO TRABALHO ?

(10C1) Não (10C2) Sim

10D. QUANTAS VEZES ISSO OCORREU, NOS ÚLTIMO ANO? _____ VEZES (nn)**10E. QUANTAS VEZES TEVE ATENDIMENTO MÉDICO POR ISSO NO ÚLTIMO ANO? _____ VEZES (nn)****10F. QUANTAS VEZES HOUVE INTERNAMENTO POR DPOC NO ÚLTIMO ANO? _____ (nn)****10H. QUANTOS DIAS NO TOTAL FOI INTERNADO POR DPOC, NO ÚLTIMO ANO? _____ (nnnn)****11. Fumo****11A. AINDA FUMA CIGARRO INDUSTRIALIZADO OU ARTESANAL? (11A1) Não (11A2) Sim****11B. QUANTOS CIGARROS O SR FUMA POR DIA? _____ CIGARROS/DIA (nn)****11C. O SR FUMA OU FUMOU MAIS CIGARRO INDUSTRIALIZADO OU ARTESANAL?**

(1) industrializado (pronto) (2) Feito a mão

11D. COM QUE IDADE O SR COMEÇOU A FUMAR REGULARMENTE? _____ ANOS (nn)**11E. EM MÉDIA QUANTOS CIGARROS POR DIA O SR FUMAVA? _____ CIGARROS/DIA (nn)****11F. IDADE QUE PAROU DE FUMAR OU EM QUE ANO? _____ ANOS ANO _____ (nn)****COMORRIDADES****12. Refere alguma das condições abaixo::****12A. DOENÇAS CARDÍACAS (12A1) Não (12A2) Sim****12B. HIPERTENSÃO (12B1) Não (12B2) Sim****12C. DIABETES (12C1) Não (12C2) Sim****12D. CÂNCER DE PULMÃO (12D1) Não (12D2) Sim****12E. AVC (12E1) Não (12E2) Sim****12F. GLAUCOMA (12F1) Não (12F2) Sim****12G. OSTEOPOROSE (12G1) Não (12G2) Sim****12H. ASIA, EPIGASTRALGIA E REGURGITAÇÃO ALIMENTAR? (12H1) Não (12H2) Sim****12I. "EMPACHAMENTO" PÓS PRANDIAL (PLENITUDE GÁSTRICA) - (12I1) Não (12I2) Sim****12J. TOSSE DURANTE A NOITE (12J1) Não (12J2) Sim****12K. TUBERCULOSE? (12K1) Não (12K2) Sim****12L. GASTRITE OU ÚLCERA (12L1) Não (12L2) Sim****12M. SINUSITE (12M1) Não (12M2) Sim****12N. ECZEMA (12N1) Não (12N2) Sim**

120. RINITE ALÉRGICA (1201) Não (1202) Sim

13. ETILISMO (> 03 cervejas ou destilado 02 doses/dia ou 08 cervejas e 06 doses/fim de semana?)
(13A1) Não (13A2) Sim

14. USA ALGUMA MEDICAÇÃO? (14A1) sim (14A2) não - QUAL: _____

15. TEM ALERGIA A ALGUM MEDICAMENTO OU ALIMENTO? (15A1) Não (15A2) Sim

16. TEM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS FREQUÊNTES? (16A1) Não (16A2) Sim

17. TEM EDEMA DE MMII? (17A1) Não (17A2) Sim

18. JÁ OBSERVOU CIANOSE DE EXTREMIDADES? (18A1) Não (18A2) Sim

Poluição Intra-domiciliar

19. REFERE CONTACTO COM FUMAÇA A LENHA EM LOCAL FECHADO? (19A1) Não (19A1) Sim

19A. POR QUANTOS ANOS ? _____ (nn)

19B. ESTE FOGÃO TEM (OU TINHA) CHAMINÉ? (19B1) Não (19B2) Sim

EXAME FÍSICO

20. PESO(Kg) _____ (nnn)

21. ALTURA (cm) _____ (nnn)

22. PRESSÃO ARTERIAL _____ x _____ (nnn x nnn)

23. IMC: _____ (23A1) IMC <25 (23A2) IMC >25

24. FREQUENCIA CARDÍACA Pulso radial _____ (nnn)

25. FREQUENCIA RESPIRATÓRIA _____ (nn)

26. MUCOSAS CONJUNTIVAS: (26A1) normocoradas (26A2) descoradas

27. ESTASE JUGULAR: (27A1) Não (27A2) Sim

28. SpO2 _____ % (nnn)

APARELHO RESPIRATÓRIO

29. AUMENTO DO DAP? - (28A1) Não (28A1) Sim

30. EXPANSIBILIDADE REDUZIDA (29A1) Não (29A2) Sim

31. ESFORÇO VENTILATÓRIO (30A1) Não (30A2) Sim

32. DIMINUIÇÃO DO MV? (31A1) Não (31A2) Sim

33. SIBILOS? (32A1) Não (32A 2) Sim

34. CREPTOS OU RONCOS (33A1) Não (33A2) Sim

35. PEACK FLOW (34A1) Normal (34A2) Reduzido

APARELHO CARDIOVASCULAR

36. PRECÓRDIO ATIVO: (36A1) Não (36A2) Sim

37. BULHAS NORMAIS: (37A1) Não (37A2) Sim EXTRAS: _____ (nn)

38. HIPOFONESE: (38A1) Não (38A2) Sim

39. SOPRO: (39A1) Não (39A2) Sim Qual? _____

ABDOME

40. SIMETRIA: (40A1) Não (40A2) Sim

41. OBESIDADE CENTRAL: (41A1) Não (41A2) Sim

42. HEPATOMEGALIA (42A1) Não (42A2) Sim

EXTREMIDADES

43. MÁ PERFUSÃO (43A1) Não (43A2) Sim

44. EDEMA MMII (44A1) Não (44A2) Sim

45. BAQUETEAMENTO DIGITAL (45A1) Não (45A2) Sim

SNC

46. LÚCIDO/ ORIENTADO	(46A1) Não	(46A2) Sim
47. AGITAÇÃO/DESORIENTAÇÃO	(47A1) Não	(47A2) Sim
48. DÉFICIT MOTOR	(48A1) Não	(48A2) Sim

NARIZ

49. HIPOCROMIA MUCOSA	(49A1) Não	(49A2) Sim
50. HIPERTROFIA CORNETOS	(50A1) Não	(50A2) Sim
51. SECREÇÃO	(51A1) Não	(51A2) Sim
52. PRURIDO	(52A1) Não	(52A2) Sim
53. OBSTRUÇÃO	(53A1) Não	(53A2) Sim

SUSPEITAS DIAGNÓSTICAS

54. ASMA (54A1) Não (54A2) Sim - SE SIM, GRAVIDADE: _____

55. RINITE: (55A1) Não (55A1) Sim

56. DPOC: (56A1) Não (56A1) Sim ESTÁGIO? (C1) I (60D) II (60E) III (60F) IV

Salvador, / / (nn/nn/nnn)

Examinador: _____
Carimbo e assinatura

XIII. 5. Ficha da contagem diferencial e global celular do escarro.**Citologia de Secreção de Vias Aéreas**

C-HUPES Complexo Hospitalar Professor Edgar Santos
 Serviço de Pneumologia – Ambulatório Magalhães Neto
 Rua Padre Feijó S/N 02 andar – Canela. Tel. 71 3339 -6105

Nome:	Data
Registro:	Sexo: Idade:
Procedência/Solicitante:	
Em uso de medicação:	

Citologia: Lavado Nasal Secreção VA I Secreção de VAS Espontâneas

Volume recuperado no Escarro
Contagem celular global $\times 10^6/\text{ml}$:

Secreção de VAI: Espontânea Induzida

Contagem Diferencial

Tipos celulares	Escarro
Epiteliais	
PMN neutrófilos	
Eosinófilos	
Mononucleares inflamatórias	

Técnica utilizada: Escarro induzido com nebulização de solução salina hipertônica 3-5% corada elo Diff-quick®

XIII. 6. Ficha de resultado do *PRICK-TEST*

C-HUPES Complexo Hospitalar Professor Edgar Santos
Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia
Serviço de Pneumologia

Nome:
 Data:
 Registro:
 Idade:
 Medicação em Uso:

Teste Cutâneo (PRICK- TEST) de Leitura Imediata

Antígenos	Reação
Diluyente (Controle Negativo)	
Epitélio de Cão	
Epitélio de Gato	
Aspergillus Fumigatus	
Blomia Tropicalis	
D. Pteronyssinus	
Histamina (Controle Positivo) <input type="checkbox"/>	

Positivo; pápula > 03 mm

Negativo; pápula < 03 mm

XIII. 7. Parecer do Comitê ética em pesquisa CEP/C-HUPES

Parecer Consubstanciado de Projeto

Título do Projeto: Avaliação da inflamação das vias aéreas pela técnica do escarro induzido (EI) e espontâneo em pacientes com Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).																								
Pesquisador Responsável Cleriston Farias Queiroz																								
Data da Versão 13/07/2012	Cadastro 113	Data do Parecer 20/09/2012																						
Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais																								
Objetivos do Projeto 2.1 Objetivo Geral: Avaliar através da técnica do escarro induzido e espontâneo a inflamação das vias aéreas, neutrófilos e eosinófilos em pacientes portadores de DPOC. Objetivo específico: Avaliar a associação entre a inflamação eosinofílica e a positividade no PRICK-TEST																								
Sumário do Projeto Trata-se de uma pesquisa observacional descritiva de análises citológica do escarro induzido e espontânea com ênfase nos eosinófilos e neutrófilos a ser realizada no Ambulatório Magalhães Neto/Serviço de Pneumologia, no Complexo Hospitalar Prof. Edgard Santos. Serão identificados pacientes com DPOC moderadas a grave nos estágios II, III e IV (GOLD) após consulta com pneumologista, a positividade do teste alérgico, avaliação do VEF ¹ e CVF através de espirometria e o escarro induzido ou espontâneo pra avaliação citológica da inflamometria. Os pacientes para o estudo proposto vêm sendo convocados e selecionados entre pacientes do serviço de pneumologia do C- HUPES. Posteriormente, serão recrutados os pacientes com DPOC moderada a grave. Após o esclarecimento dos objetivos e intervenções a serem realizadas no âmbito do estudo, e uma vez obtendo o consentimento individual por escrito, os pacientes são submetidos as técnica do escarro induzido, espirometria bem como o teste cutâneo de leitura imediata. As informações epidemiológicas e resultados laboratoriais são inseridos em um banco de dados. Os resultados da análise dos dados serão apresentados em congressos e serão publicados em periódicos científicos da área e em teses acadêmicas.). O escarro induzido (EI), inicialmente utilizado para o diagnóstico de câncer de pulmão e, posteriormente, para doenças infecciosas, foi metodologicamente reestudado e aceito como um instrumento de investigação da patogenia da asma. Na DPOC, o EI ainda está sendo agregado como uma ferramenta para o aprimoramento do conhecimento do processo inflamatório devido a sua segurança, reprodutividade e baixo custo. O aspecto revolucionário do tratamento anti-inflamatório da DPOC não requer somente tratamento medicamentoso, mas estudos cada vez mais aprofundados sobre a síndrome inflamatória sistêmica que é esta doença em questão. Finalmente, parece que estamos passando pra outra fase no tratamento da DPOC, procurando atingir o controle da doença (exacerbações, perda da qualidade de vida, mortalidade, comorbidade).																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Aspectos relevantes para avaliação</th> <th style="text-align: left;">Situação</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Título</td> <td>Adequado</td> </tr> <tr> <td>Relação dos Pesquisadores</td> <td>Adequada</td> </tr> <tr> <td>Local de Origem na Instituição</td> <td>Adequado</td> </tr> <tr> <td>Projeto elaborado por patrocinador</td> <td>Não</td> </tr> <tr> <td>Local de Realização</td> <td>Própria instituição</td> </tr> <tr> <td>Outras instituições envolvidas</td> <td>Não</td> </tr> <tr> <td>Condições para realização</td> <td>Adequadas</td> </tr> <tr> <td>Introdução</td> <td>Adequada</td> </tr> <tr> <td>Objetivos</td> <td>Adequados</td> </tr> <tr> <td>Método</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Aspectos relevantes para avaliação	Situação	Título	Adequado	Relação dos Pesquisadores	Adequada	Local de Origem na Instituição	Adequado	Projeto elaborado por patrocinador	Não	Local de Realização	Própria instituição	Outras instituições envolvidas	Não	Condições para realização	Adequadas	Introdução	Adequada	Objetivos	Adequados	Método	
Aspectos relevantes para avaliação	Situação																							
Título	Adequado																							
Relação dos Pesquisadores	Adequada																							
Local de Origem na Instituição	Adequado																							
Projeto elaborado por patrocinador	Não																							
Local de Realização	Própria instituição																							
Outras instituições envolvidas	Não																							
Condições para realização	Adequadas																							
Introdução	Adequada																							
Objetivos	Adequados																							
Método																								

Página 1-3
Versão 01/2004

Tipo de projeto	Pesquisa em Seres Humanos
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 40 Na Instituição 40
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Não se aplica
Instrumentos de coleta de dados	Não apresentados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
<u>Adequação às Normas e Diretrizes</u>	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	01/2012
Data de término prevista	12/2013
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Não
Referências Bibliográficas	Adequadas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

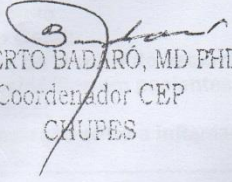
O projeto de pesquisa cumpriu todos os requisitos da Resolução CNS 196/96.

Informações ao Pesquisador:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em
/ / e ao término do estudo.

Projeto Aprovado.


ROBERTO BADARÓ, MD PHD
Coordenador CEP
CHUPES

Recebido em
03/10/12
por Autuária de Sousa Alus
Autuária Alus.